

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Гурина Вероника Валериевна

**ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОГО СОСТАВА
ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ КОРНЕПЛОДОВ *BETA VULGARIS* L.
ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ**

1.5.21 – физиология и биохимия растений

**диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор биологических наук
Озолина Наталья Владимировна**

Иркутск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Общая характеристика растительных вакуолей	11
1.2. Особенности строения вакуолярных мембран	13
1.2.1. Современные представления о структуре мембран.....	13
1.2.1. Вакуолярная мембрана.....	15
1.3. Липидный состав вакуолярной мембраны	16
1.3.1. Жирные кислоты липидов.....	18
1.3.2. Нейтральные липиды	22
1.3.3. Полярные липиды.....	26
1.4. Влияние абиотических стрессовых воздействия на растения	30
1.4.1. Окислительное стрессовое воздействие и изменение мембранных липидов	33
1.4.2. Гиперосмотическое стрессовое воздействие и изменение мембранных липидов	36
1.4.3. Гипоосмотическое стрессовое воздействие и изменение мембранных липидов	40
1.5. Роль липидов в защите от абиотических стрессовых воздействий	42
1.6. Выводы из обзора литературы.....	51
2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1. Объект исследования	52
2.2. Условия создания стрессового воздействия	52
2.3. Методы для характеристики стрессовых воздействий.....	53
2.3.1. Кондуктометрический метод	53
2.3.2. Метод компьютерной цейтраферной видеосъемки микроскопических образцов	53
2.3.3. Определение содержания диеновых конъюгатов	54

2.4. Макрообъемный метод выделения вакуолей.....	55
2.5. Метод выделения тонопласта	55
2.6. Экстракция липидов.....	56
2.7. Анализ жирнокислотного состава липидов	56
2.8. Качественный и количественный анализ фосфолипидов	57
2.9. Качественный и количественный анализ гликоглицеролипидов	59
2.10. Количественный анализ стерина	60
2.11. Используемые реактивы	60
2.12. Статистическая обработка данных.....	61
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. Оценка влияния стрессовых воздействий	62
3.2. Влияние окислительного стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта	65
3.3. Влияние гиперосмотического стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта	75
3.4. Влияние гипоосмотического стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	– активные формы кислорода
ГЛ	– гликоглицеролипиды
ГФИ	– гликозилфосфатидилинозиты
ДГДГ	– дигалактозилдиацилглицерины
ДК	– диеновые конъюгаты
ЖК	– жирные кислоты
ИДС	– индекс двойных связей
ЛФХ	– лизофосфатидилхолины
МГДГ	– моногалактозилдиацилглицерины
МЭЖК	– метиловые эфиры жирных кислот
НЖК	– насыщенные жирные кислоты
НЛ	– нейтральные липиды
ННЖК	– ненасыщенные жирные кислоты
ПННЖК	– полиненасыщенные жирные кислоты
ПЛ	– полярные липиды
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПФИ	– полифосфатидилинозиты
СТ	– стерины
СХДГ	– сульфохиновазилдиацилглицерины
ФГ	– фосфатидилглицерины
ФИ	– фосфатидилинозиты
ФК	– фосфатидная кислота
ФЛ	– фосфолипиды
ФС	– фосфатидилсерины
ФХ	– фосфатидилхолины
ФЭ	– фосфатидилэтаноламины
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР	– эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В силу прикрепленного образа жизни растения зависят от сезонных или глобальных климатических колебаний. Неблагоприятные факторы окружающей среды отрицательно влияют на метаболические процессы в растениях, вызывая молекулярные, биохимические, физиологические и морфологические изменения (Chaudhry and Sidhu, 2021). Так, например, гиперосмотический стресс вызывает потерю тургора клеток, нарушение функционирования мембран, снижение активности или денатурацию белков, образование избыточных концентраций активных форм кислорода (АФК), приводящих к окислительному стрессу, ингибирование фотосинтеза, метаболическую дисфункцию, повреждение клеточных структур, что в дальнейшем приводит к снижению роста и продуктивности растений. В процессе эволюции у растений выработались различные механизмы адаптации при стрессовых условиях (He et al., 2018).

В живой клетке с различными внешними воздействиями первыми сталкиваются именно биологические мембраны. Это высокоупорядоченные структуры, состоящие из липидов и белков, ответственные за выполнение основных процессов жизнедеятельности клетки (Лось, 2001). Они обеспечивают поступление в клетку и клеточные органеллы всех необходимых веществ и вывод из клетки продуктов ее жизнедеятельности. Мембранные липиды отвечают за поддержание текучести, проницаемости, целостности мембраны, влияют на регуляцию белков и функционирование мембранного транспорта (Orvar et al., 2000; Rawat et al., 2021). При абиотических стрессовых воздействиях функции клеточных мембран изменяются, при этом нарушается синтез липидов, а также происходит их гидролиз.

Способность растений изменять липидный и белковый состав мембран играет решающую роль в адаптации к стрессам. Изменения липидного состава влияют не только на физические свойства мембраны. Показано, что при стрессе может увеличиваться синтез уникальных липидов, которые в нормальных

условиях содержатся в следовых количествах (Welti, 2002; Okazaki and Satio, 2014). Такие липиды могут являться сигнальными молекулами или быть предшественниками вторичных мессенджеров. В сигнальные системы вовлечены различные классы липидов, включая жирные кислоты, фосфатидную кислоту, фосфатидилинозиты, лизофосфолипиды, диацилглицерины, сфинголипиды, оксипирины и N-ацилэтаноламины (Moradi et al., 2017). Определенные мембранные липиды (стерины и сфинголипиды) участвуют в образовании рафтовых структур. Липидные рафты – это особые области (микродомены) бислоя, которые характеризуются более высокой плотностью и температурой плавления. Предполагается, что эти структуры обеспечивают мембранные контакты (места сближения мембран двух органелл), участвуют в сигналинге, транспорте и апоптозе (Annunziata et al., 2015; Kapustina et al., 2021).

У растений для запасаания, детоксикации и деградации эндогенных и экзогенных соединений, а также для защиты при стрессе на клеточном уровне служит центральная вакуоль. Наличие этой органеллы является отличительной особенностью растительных клеток. Внутреннее пространство вакуоли отделено от цитоплазмы вакуолярной мембраной (тонопластом) (Taiz and Zeiger, 2010). Как и плазмалемма, вакуолярная мембрана относится к пограничным мембранам растительной клетки, и принимает активное участие не только в поддержании тургора клетки, но и в регуляции транспорта метаболитов, обеспечивая запасающую, регуляторную и защитную функции. На вакуолярной мембране также были обнаружены и рафтовые структуры (Ozolina et al., 2013).

В настоящее время достаточно хорошо изучены качественные и количественные изменения в липидном профиле плазмалеммы, мембран хлоропластов и митохондрий в ответ на стрессовые воздействия окружающей среды (Okazaki and Saito, 2014). Исследования липидного состава тонопласта проводились только при разных видах температурного стресса (Kasamo et al.,

1992; Behzadipour et al., 1998; Lin et al., 2008; Zhou et al., 2014). Влияние осмотического стресса на липидный состав тонопласта ранее подробно не проводилось. Изучение изменений липидного состава тонопласта при осмотическом и окислительном стрессовых воздействиях может быть полезным при селекционировании и создании генетически модифицированных растений для получения значительных урожаев при неблагоприятных условиях окружающей среды.

Цель работы. Исследовать липидный состав тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* при абиотических стрессах для выяснения возможной роли липидов в защитных механизмах растительной клетки.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Создать и оценить условия стрессового воздействия на корнеплоды *Beta vulgaris*.
2. Провести анализ качественных и количественных изменений преобладающих липидов (фосфолипидов, гликоглицеролипидов), стерина и жирнокислотного состава общих липидов вакуолярной мембраны в условиях окислительного стресса.
3. Исследовать качественные и количественные изменения преобладающих липидов (фосфолипидов, гликоглицеролипидов), стерина и жирнокислотного состава общих липидов вакуолярной мембраны в условиях гиперосмотического стресса.
4. Изучить качественные и количественные изменения преобладающих липидов (фосфолипидов, гликоглицеролипидов), стерина и жирнокислотного состава общих липидов вакуолярной мембраны при гипоосмотическом стрессовом воздействии.
5. Оценить возможную роль липидов тонопласта в защите растительной клетки от стресса.

Положение, выносимое на защиту. Липиды вакуолярной мембраны принимают участие в защите растительной клетки от абиотических стрессовых воздействий. Для каждого стресса характерны общие и специфические изменения липидного состава, которые определяют стратегию защиты растительных клеток в окислительных и осмотических условиях стресса.

Научная новизна. Впервые получены данные о количественных и качественных изменениях содержания фосфолипидов, гликоглицеролипидов, стерина и жирных кислот вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris* при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессе, что позволило выявить специфические и неспецифические стратегии защиты растительных клеток от стресса, связанные с липидами вакуолярной мембраны. При всех изучаемых стрессовых воздействиях отмечено увеличение содержания минорных жирных кислот и кампестерина, снижение количества фосфатидной кислоты и отношения стигмастерин/ β -ситостерин. Особенностью реакции мембранных липидов на окислительный стресс было существенное увеличение всех классов стерина, что, по-видимому, связано с усилением такого важного процесса как аутофагия. При гиперосмотическом стрессе было отмечено уменьшение гликоглицеролипидов, а также отношения фосфатидилхолин/фосфатидэтаноламин. Гипоосмотическое стрессовое воздействия особенно повлияло на рост уровня фосфатидилинозитов. Большая часть выявленных изменений липидного состава тонопласта связана со стабилизацией бислоевой структуры мембраны и сигнальными функциями липидов, что характерно и для других мембран растительной клетки.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты детального исследования изменения липидного состава вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris* при окислительном и осмотических стрессах значимы для понимания механизмов адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды. Особенности изменения липидного состава при

изучаемых стрессовых воздействиях важны для создания толерантных к стрессу растений сельскохозяйственного назначения.

Материалы диссертации могут быть рекомендованы при разработке курсов лекций по физиологии растений и биохимии на кафедрах соответствующего профиля.

Апробации работы. Результаты исследования по теме научно-квалификационной работы были представлены и обсуждались на Международной молодежной научно-практической конференции Россия-Монголия (Иркутск, 2016), 20-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016), IX Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз – Россия 2016» (Томск, 2016), Всероссийской конференции и Школе-семинаре с международным участием «Роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе распространенных патологий» (Иркутск, 2016), Всероссийской научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2016), II Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки» (Иркутск, 2018), Годичном собрании Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018), Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 100-летию Иркутского государственного университета «Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных территорий» (Иркутск, 2018), IX Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019), Всероссийской научной конференции с международным участием «Липиды 2021» (Москва, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 статей в журналах из Перечня ВАК РФ и 1 статья в иностранном журнале.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, список литературы, включающий 247 источника. Работа изложена на 124 страницах, содержит 27 рисунков и 9 таблиц.

Работа выполнена в лаборатории физиологии растительной клетки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН, г. Иркутск).

Личный вклад автора. Диссертация написана автором самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах подготовки диссертационной работы: планирование и постановка экспериментов, оценка условий стрессовых воздействий, подготовка материала, анализ липидов, стерина, жирнокислотного состава общих липидов, статистическая обработка данных, подготовка публикаций на основе полученных результатов, апробация на конференциях.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному руководителю д.б.н. Н. В. Озолиной за профессиональную помощь, научные дискуссии по работе с публикациями и рукописи. Автор благодарит за помощь в работе, важные замечания и поддержку к.б.н. И. С. Капустину, к.б.н. Е. В. Спиридонову, Н. В. Семенову, к.б.н. В. Н. Нурминского, Т. И. Лаптеву, Л. А. Ситневу, В. А. Галиченко и всех сотрудников лаборатории физико-химических методов исследования. Автор искренне благодарен за ценные рекомендации при обсуждении работы д.б.н. Т. П. Побежимовой, д.б.н. Л. Е. Макаровой, к.б.н. Н. В. Дорофееву и к.б.н. А. В. Поморцеву.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика растительных вакуолей

Наличие крупной центральной вакуоли является отличительной особенностью строения растительных клеток. Вероятно, вакуоли возникли на ранней стадии биологической эволюции и впоследствии прогрессировали для выполнения различных функций в водорослях, грибах и растениях (Marty, 1999). Вакуоль – это многофункциональная органелла, ограниченная мембраной – тонопластом, который отделяет внутреннее пространство вакуоли от цитоплазмы. Благодаря полупроницаемости тонопласт поддерживает баланс питательных веществ и ионов в цитоплазме и в вакуоли, тем самым создавая необходимое тургорное давление в растительной клетке. В вегетативных клетках может быть всего одна вакуоль, которая занимает до 90% от общего клеточного объема. За счет растяжения клеточного объема растение оптимизирует поверхность поглощения солнечного света в процессе фотосинтеза.

Вакуолярная система играет важную роль в жизнедеятельности клеток всех царств живой природы. Она связана с процессами распада и транспорта органических веществ и представляет собой систему, состоящую из канальцев, цистерн и пузырьков, которые сообщаются между собой путем установления постоянных или временных связей в результате слияния их мембран. Последние достижения в области визуализации растительных вакуолей выявили у них весьма организованную и сложную морфологию и динамику. Тонопласт окружает не только центральную вакуоль, но и другие короткоживущие динамические структуры, такие как трансвакуолярные тяжи и везикулы. Трансвакуолярные тяжи – это динамические тонкие трубчатые структуры, которые пересекают центральную вакуоль, обеспечивают прямую связь между различными областями цитоплазмы клетки и действуют как важный транспортный путь для распределения цитоплазматического содержимого вместе с органеллами небольшого размера (Madina et al., 2019).

В зависимости от функции вакуоли подразделяют на два типа: запасающие белки (в клетках репродуктивных органов и семян) и литические (выполняют лизосомные функции) (Martinoia et al., 2007). В одной и той же клетке могут сосуществовать два типа вакуолей. В зрелых тканях часто вакуоли разных типов сливаются и образуют большую центральную вакуоль, которая имеет и запасающую, и литическую функции (Carter, 2004). Вакуоли очень динамичны и плеiomорфны, их морфология изменяется в зависимости от условий окружающей среды, а также роста и развития растений. Вакуоли содержат H^+ -АТФазы, H^+ -пирофосфатазы и ТІР-аквапорины. Изоформы ТІР-аквапоринов определяют разные функции вакуолей. Например, тонопласт вакуолей, запасающих белки у семян, содержит α -ТІР и δ -ТІР, а иногда и γ -ТІР, тогда как тонопласт вакуолей, хранящих белки и пигменты, содержат δ -ТІР и γ -ТІР. Вакуоли, содержащие только γ -ТІР, обладают характеристиками литических вакуолей (Jauh et al., 1999).

Важная роль центральной вакуоли – это поддержание тургора, но также она участвует в хранении первичных и вторичных метаболитов, питательных и минеральных веществ, токсических соединений (кадмий, мышьяк). Анализ изолированных вакуолей показал, что от 53% до 90% ионов натрия и около 50% ионов калия клетки находятся в вакуолях (Leigh et al., 1983). Вакуоли также накапливают продукты гормонального обмена, которые участвуют в поддержании гормонального гомеостаза цитоплазмы. В запасающих тканях корнеплодов *Beta vulgaris* сахара, основная часть кислой инвертазы и фосфатазы находятся в вакуолях (Leigh et al., 1979). Накопление сахаров в вакуолях в холодный период повышает устойчивость растений к низкотемпературным стрессам (Pommerrenig et al., 2018).

У дрожжей и растений вакуоли участвуют в процессе аутофагии. Аутофагия – это основной механизм, позволяющий контролировать разрушение и переработку клеточных компонентов. Вакуоль является местом деградации белков, выполняет лизосомные функции благодаря ферментам,

которые способны катализировать гидролиз всех основных компонентов: нуклеиновых кислот, белков, углеводов и липидов (Taiz and Zeiger, 2010). Некоторые белки, которые распадаются в вакуолях, важны в сигналинге гормонов, ответных реакциях растений на биотические воздействия (Bayle et al., 2011).

1.2. Особенности строения вакуолярных мембран

1.2.1. Современные представления о структуре мембран

Биомембраны состоят из двух слоев молекул липидов. Бислой имеют гидрофильную внешнюю поверхность и гидрофобное внутреннее пространство. Вехой в развитии концепции строения биомембран стала разработка модели предложенной Сингером и Никольсоном в 1972 г. Липиды вместе с пронизывающими бислой белковыми молекулами образуют основу структуры биологических мембран клетки, где происходят главные процессы жизнедеятельности (Болдырев и др., 2006). Позже Никольсоном были внесены дополнения в существующую модель (рис. 1). Показаны различные типы взаимодействий, которые возникают между интегральными мембранными белками и гликопротеинами, мембранными липидами, мембранно-связанными цитоскелетными системами и компонентами внеклеточного матрикса. Эти взаимодействия влияют на подвижность, распределение и агрегатное состояние компонентов мембраны. Выявлено, что белковые комплексы не всегда свободно передвигаются в липидном бислое, а могут быть прикреплены к микрофиламентам и микротрубочкам (Nicolson, 2014).

Ранее считалось, что в клеточных мембранах белки отвечают за их функцию, а липиды – в основном за структуру. Однако в настоящее время принято считать, что липиды также могут влиять на выполнение функций биомембранами (Верещагин, 2007). Важным параметром липидного бислоя является толщина гидрофобной части, которая зависит от длины ацильных цепей жирных кислот липидов. Толщина гидрофобной части мембраны влияет на конформацию интегральных белков: толщина гидрофобной области белка

обычна близка толщине гидрофобной части окружающего липидного бислоя. Изменение толщины гидрофобной части липидного бислоя в любую сторону, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения, приведет к изменению конформации мембранного белка и к значительному снижению его активности. Структура гидрофильной головной группы липидов также влияет на функцию мембранных белков (Lee, 2003).

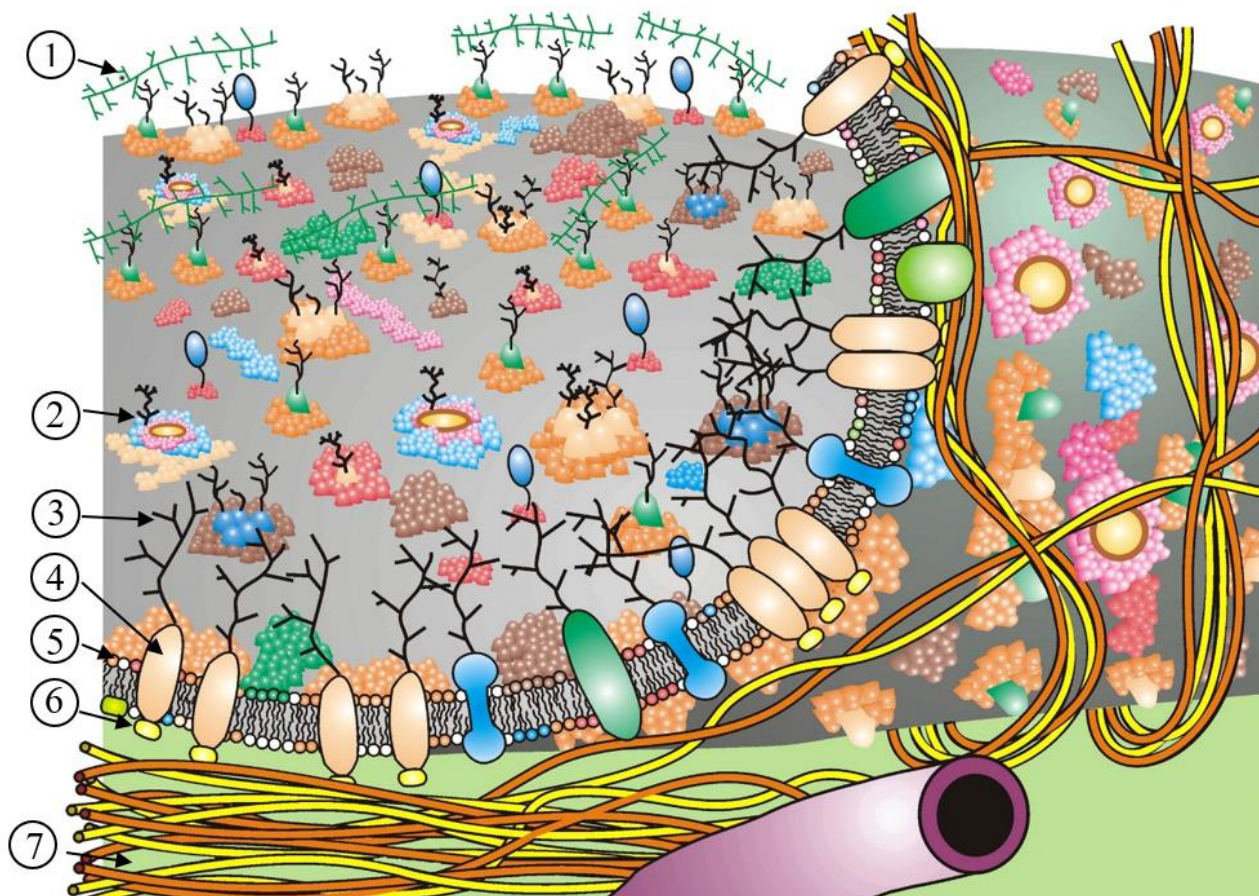


Рис. 1. Схематическое изображение биологической мембраны согласно обновленной жидкостно-мозаичной модели (Nicolson, 2014)

Обозначения: 1 – комплекс полисахарид-гликопротеин, 2 – липидный домен, 3 – олигосахарид, 4 – интегральный белок, 5 – фосфолипиды, 6 – поверхностный белок, 7 – нити цитоскелета.

Активные исследования мембран позволили по-новому взглянуть на их морфологию, организацию и функционирование. Обнаружено, что липиды участвуют в образовании частично изолированных областей бислоя – липидных рафтов. Они имеют отличную от мембраны плотность и температуру

плавления, поэтому могут «плавать» на поверхности неупорядоченной жидкостной мембраны. Это связано с наличием в рафтах стерина, сфинголипидов и липидов с насыщенными жирными кислотами. В настоящее время такие участки мембраны называют доменами, иногда с приставкой микро- или нано-, в зависимости от их размера. Предполагается, что рафты – это короткоживущие агрегаты, содержащие более 1000 молекул липидов и имеющие почти круглую форму, которые быстро восстанавливаются после самоорганизации. Эти мембранные микродомены участвуют в различных биологических процессах: межклеточных взаимодействиях, мембранном транспорте, переносе белков, передаче сигнала, в стрессовых реакциях (Simons and Ikonen, 1997; Kapustina et al., 2021).

1.2.1. Вакуолярная мембрана

Вакуолярная мембрана отделяет цитоплазму от внутреннего пространства вакуоли. Тонoplast служит барьером для предотвращения утечки из вакуоли запасаемых веществ и имеет активно действующие системы транспорта веществ против градиента концентрации или электрохимической активности. Изолированная вакуолярная мембрана имеет толщину 9,5-10 нм (Салеев, Чернышов, 1975). Полупроницаемый тонoplast поддерживает баланс питательных веществ и ионов внутри и вне вакуоли.

Тонoplast содержит несколько классов мембранных белков: H^+ -АТФаза, H^+ -пирофосфатаза, ABC-транспортеры, интегральные белки тонoplastа (TIP) (Jauh et al., 1999; Neuhaus and Trentmann, 2014), белки SNARE, участвующие в биогенезе и слиянии вакуолей (Ebene et al., 2008). Белки тонoplastа осуществляют и регулируют транспорт молекул воды, ионов, продуктов метаболизма. В ответ на изменения в цитоплазматической среде изменяется активность ферментов, транспортеров и каналов тонoplastа, тем самым регулируется биомолекулярный обмен между цитоплазмой и полостью вакуоли, поддерживается клеточный гомеостаз (Zhang et al., 2014).

Липиды в тонопласте обеспечивают среду для мембранных белков, а также являются барьером между цитоплазмой и содержимым вакуоли. В сравнении с плазмалеммой, тонопласт содержит меньше стерина и больше фосфолипидов. Высокое содержание фосфолипидов придает тонопласту большую эластичность, благодаря этому он может выдерживать большое давление клеточного сока, растягиваться и уменьшаться в объеме. Вакуолярная мембрана растительных клеток имеет более высокий процент стерина, чем тонопласт дрожжей. На долю углеводов может приходиться около 10% массы биомембран, которые входят в состав гликолипидов или гликопротеинов (Макаренко и др., 1992).

1.3. Липидный состав вакуолярной мембраны

Липиды – обширный класс химических соединений, содержащих алифатические или ароматические углеводородные группы, плохо растворимых в воде в мономерной форме (Артюхов и др., 2000). Липиды можно определить как гидрофобные или амфипатические небольшие молекулы, которые могут образовываться полностью или частично за счет карбанионной конденсации кетоацилтиоэфиров и/или за счет карбокатионной конденсации изопреновых фрагментов.

В настоящее время липиды классифицируют по различным признакам, однако ни одна из предложенных классификаций не является исчерпывающей. Классически липиды подразделяют на простые, сложные и оксипипины (эйкозаноиды). Простые липиды – при их гидролизе образуют не более двух типов отдельных веществ, а сложные липиды – три или более. Например, глицерофосфолипиды состоят из жирных кислот, глицерина и головной группы (Fahy et al., 2011). Сложные липиды обычно делят на две подгруппы, которые называют нейтральные (глицериды, воски, стерина, N-ацилэтаноламида, церамида) и полярные липиды. В свою очередь, полярные липиды делят на глицерофосфолипиды (фосфолипиды) и гликолипиды (гликоглицеролипиды или гликофинголипиды) (Филиппов и др., 2006). Оксипипины образуются

только из определенных полиеновых жирных кислот: арахидоновой, дигомо-гамма-линоленовой и эйкозапентаеновой (Васьковский, 1997).

Существует более современная классификация липидов на основе классификации липидов, которую разработал в 2005 г. Международный комитет по классификации и номенклатуре липидов по инициативе Консорциума LIPID MAPS. Липиды были разделены на восемь категорий: вещества ацильной природы, глицеролипиды (глицериды), глицерофосфолипиды, сфинголипиды, гликолипиды, поликетиды, стероидные и пренольные липиды (Fahy et al., 2011).

Количественное и качественное содержание разных видов липидов определяют организацию клеточных мембран. Липиды также являются источниками энергии и тепла, сигнальными молекулами, платформами для моделирования функции и структуры белков (Акмурзина и др., 2012). Некоторые липиды способствуют стабилизации сильно искривленных участков мембраны, образованию контакта между мембранами или связыванию определенных белков (Harayama and Riezman, 2018).

Липидный состав тонопласта варьирует у различных видов растений. В мембране вакуолей из клеток мезофилла листьев *Avena sativa* были обнаружены фосфолипиды (ФЛ) (31% от общего количества липидов), гликоглицеролипиды (ГЛ) (28,6%), стерины (СТ) (21%) и цереброзиды (19,6%) (Verhoek et al., 1983). Тонопласт из этиолированных гипокотилей *Vigna radiate* состоял из ФЛ (51%), СТ (27,9%), церамидов (16,6%) и ГЛ (4,4%) (Yoshida, Uemura, 1986). Вакуолярная мембрана культивируемых клеток *Acer pseudoplatanus* имела ФЛ (44,5%), ГЛ (39,1%) и нейтральные липиды (НЛ) (16,4%) (Tavernier et al., 1993). Липидный состав фракции тонопласта, полученного из клеток *Oryza sativa* состоял из ФЛ (38%), ГЛ (31,1 %), СТ (27,3%) и цереброзидов (7%) (Yamaguchi and Kasamo, 2001).

1.3.1. Жирные кислоты липидов

Жирные кислоты (ЖК) – твердые кристаллические вещества, практически лишенные запаха, хорошо растворимы в спирте и эфире. В настоящее время в растительном мире известно более 400 природных ЖК, отличающихся по степени и характеру разветвления углеродной цепи, числу и положению двойных связей, природе и количеству других функциональных групп и, наконец, по длине углеродной цепи. Как правило, они имеют четное число углеродных атомов, причем преобладающим является кислоты с 14-22 атомами углерода в молекуле. По степени насыщенности углеродной цепи атомами водорода различают насыщенные (предельные) (НЖК) и ненасыщенные (непредельные) (ННЖК) ЖК (He et al., 2020).

Биосинтез жирных кислот в растениях протекает в каждой клетке, не ограничивается определенными тканями или органами. Синтез ЖК *de novo* в растениях происходит в пластидах. С помощью радиоактивно меченого ацетата с 14 углеродными атомами в *Arabidopsis thaliana* было показано, что 38% синтезируемых ЖК *de novo* попадают в прокариотический путь синтеза липидов, а 62% экспортируются в эукариотический. После десатурации в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) 56% (34% от общего числа) ЖК возвращаются в пластиды для дальнейшего синтеза гликоглицеролипидов по прокариотическому пути (Browse et al., 1986).

Процесс образования ЖК из ацетата цикличен и катализируется мультиэнзимным комплексом – синтазой ЖК (Li-Beisson et al., 2013). Ацетил-КоА, является основным строительным элементом цепи ЖК и входит в путь синтеза ЖК как в качестве субстрата для ацетил-КоА-карбоксилазы (реакция 1), так и в качестве праймера для начальной реакции конденсации (реакция 3) (рис. 2). Ацилпереносящий белок (АПБ), переносит малонил от КоА с образованием малонил-АПБ, который является донором углерода для всех последующих реакций удлинения (реакция 2). После каждой конденсации 3-кетואцил-АПБ восстанавливается (реакция 4), дегидратируется (реакция 5) и снова

восстанавливается (реакция 6) 3-кетоацил-АПБ редуктазой, 3-гидроксиацил-АПБ дегидразой и еноил-АПБ редуктазой соответственно (Ohlrogge and Browse, 1995).

При всем многообразии ЖК, у высших растений доминирующими являются в основном насыщенная пальмитиновая ЖК (C16:0) и две ненасыщенные ЖК – олеиновая (C18:1) и линолевая (C18:2). Насыщенной стеариновой ЖК (C18:0) в растениях содержится немного, а кислоты от C₂₀ до C₂₄ присутствуют не всегда и также в небольших количествах (Жеребцов др., 2002). В вакуолярных мембранах также обнаружено высокое содержание пальмитиновой (C16:0) ЖК в фосфатидилглицеринах (Yoshida et al., 1986; Tavernier et al., 1993).

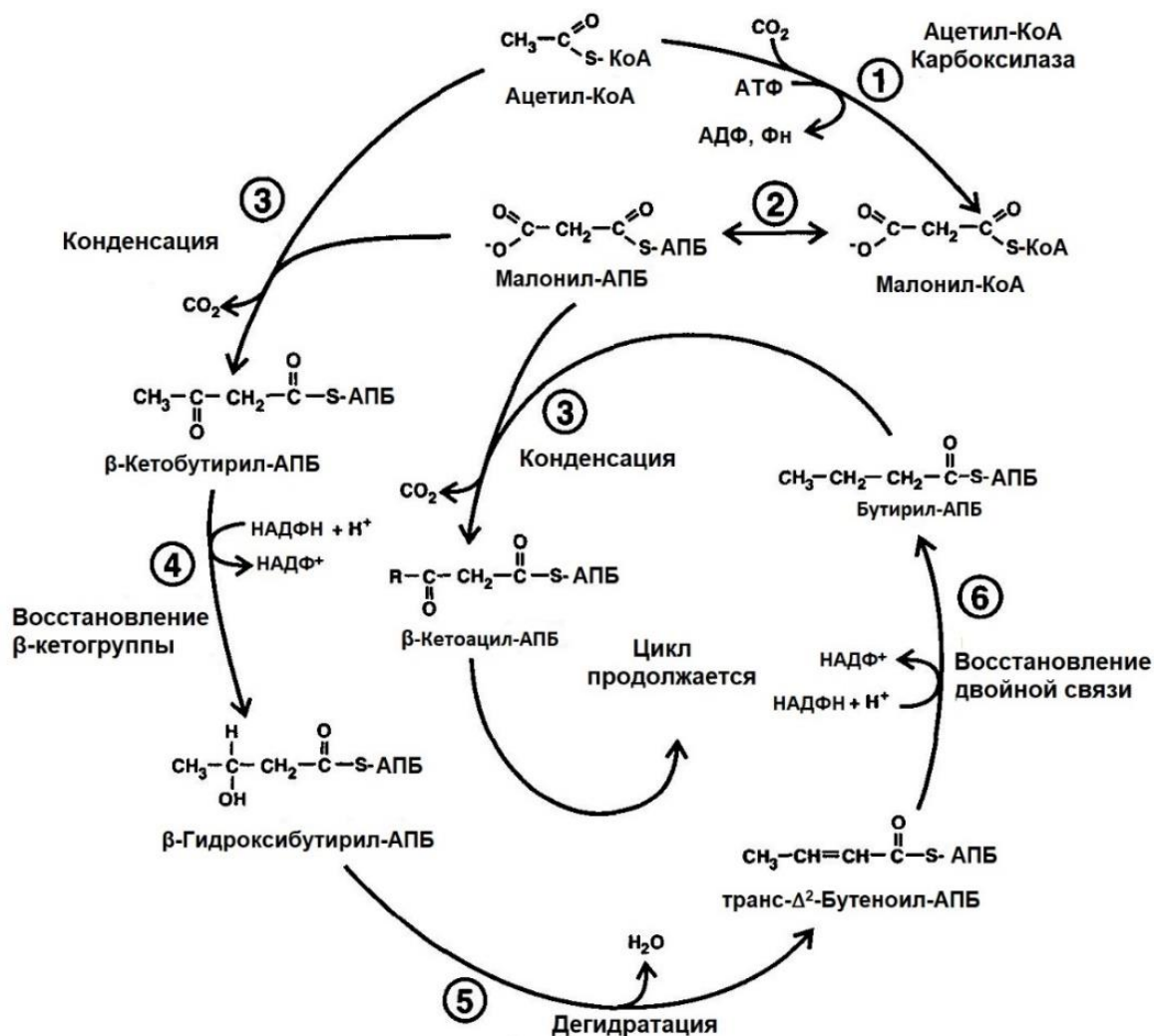


Рис. 2. Реакции биосинтеза жирных кислот (Ohlrogge and Browse, 1995)

В таблице 1 приведен жирнокислотный состав вакуолярных мембран корнеплодов *Pastinaca sativa*, *Petroselinum crispum*, *Dacus carota*, *Beta vulgaris*, гипокотилей *Vigna unguiculata*, листьев *Kalanchoë daigremontiana* и плодов *Ananas comosus*.

Таблица 1

Жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран (% от суммы ЖК)

Жирные кислоты	<i>Pastinaca sativa</i> L. ¹	<i>Petroselinum crispum</i> L. ¹	<i>Dacus carota</i> L. ¹	<i>Beta vulgaris</i> L. ²	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp ³	<i>Kalanchoë daigremontiana</i> Ham. et Per. ⁴	<i>Ananas comosus</i> ⁵
12:0, лауриновая	0,1	-	0,1	0,5	-	-	-
13:0, тридециловая	-	-	0,1	-	-	-	-
14:0, миристиновая	0,4	0,5	1,0	-	-	-	1,35±0,07
14:1(n-9), миристолеиновая	-	-	0,7	-	-	-	-
14:2(n-6)	-	-	0,2	-	-	-	-
15:0, пентадекановая	0,5	0,5	1,0	0,9	-	-	-
15:1, пентадеценовая	-	-	-	0,3	-	-	-
16:0, пальмитиновая	19,9	18,0	20,7	28,3	41,4	32,3	29,9±1,35
16:1(n-9), пальмитолеиновая	0,2	0,3	1,1	-	-	-	-
16:1(n-7), пальмитолеиновая	0,6	0,7	0,3	0,3	-	-	0,69±0,03
16:2(n-6)	8,0	4,6	0,7	-	-	-	-
16:3(n-3)	-	-	0,2	-	-	-	-
17:0, маргариновая	0,2	0,2	0,7	0,2	-	-	-
17:1, маргаринолеиновая	-	-	-	0,2	-	-	-
18:0, стеариновая	1,3	1,2	3,0	2,9	7	5	4,1±0,18

Продолжение таблицы 1

Жирные кислоты	<i>Pastinaca sativa</i> L. ¹	<i>Petroselinum crispum</i> L. ¹	<i>Dacus carota</i> L. ¹	<i>Beta vulgaris</i> L. ²	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp ³	<i>Kalanchoë daigremontiana</i> Ham. et Per. ⁴	<i>Ananas comosus</i> ⁵
18:1(n-12), петроселиновая	-	-	4,9	-	-	-	-
18:1(n-9), олеиновая	5,5	7,5	0,6	21,5	-	4,7	26,24±1,2
18:1(n-7), цис-вакценовая	1,3	1,4	-	-	-	-	-
18:2(n-6), линолевая	53,5	55,1	54,9	39,6	27,6	34,2	25,7±1,11
18:3(n-6), γ- линоленовая	0,9	0,7	0,4	-	-	-	-
18:3(n-3), α-линоленовая	5,1	7,3	4,8	3,9	24	23,7	12±0,49
20:0, арахиновая	0,2	0,2	0,7	-	-	-	-
20:1(n-9), эйкозеновая	0,1	0,1	0,2	-	-	-	-
20:1(n-7), эйкозеновая	-	0,1	2,4	-	-	-	-
20:2(n-6), эйкозодиеновая	0,2	0,3	0,1	-	-	-	-
20:3(n-6), эйкозатриеновая	-	0,3	0,3	-	-	-	--
22:0, бегеновая	0,7	0,4	0,9	-	-	-	-
23:0, трикозановая	0,3	-	-	-	-	-	-
24:0, лигноцериновая	0,7	0,5	-	-	-	-	-
Σ НЖК	24,3	21,6	28,3	34,0	48,4	37,3	35,34
Σ ННЖК	75,7	78,4	71,7	65,7	51,6	62,7	64,64
ИДС	1,48	1,53	1,38	-	-	-	1,14±0,06

Примечание: 1 – Макаренко и др., 2007; 2 – Макаренко и др., 1992; 3 – de Oliveira et al., 2009; 4 – Behzadipour et al., 1998; 5 – Zhou et al., 2014.

В составе липидов вакуолярных мембран всех представленных растений преобладают ННЖК. В тонопласте корнеплодов *Pastinaca sativa*, *Petroselinum crispum*, *Dacus carota* и *Beta vulgaris* среди ННЖК больше всего обнаружено

линолевой (C18:2(n-6)) ЖК, тогда как в тонопласте гипокотилей *Vigna unguiculata*, листьев *Kalanchoë daigremontiana* и плодов *Ananas comosus* отмечено высокое содержание и линолевой (C18:2(n-6)) и линоленовой (C18:3) ЖК, а в тонопласте плодов *Ananas comosus* еще и олеиновой (C18:2(n-7)) ЖК. Среди НЖК липидов вакуолярных мембран всех рассматриваемых объектов преобладала пальмитиновая ЖК (Макаренко и др., 1992; Behzadipour et al., 1998; Макаренко и др., 2007; de Oliveira et al., 2009; Zhou et al., 2014). Жирнокислотный состав липидов вакуолей показал, что большое количество глицеролипидов с длинноцепочечными ненасыщенными жирнокислотными остатками связано в первую очередь с функциональными особенностями вакуолей: транспортом и запасанием в них различных метаболитов, поддержанием осмотического потенциала и выполнением лизосомных функций (Макаренко и др., 2007).

В некоторых работах был проанализирован ЖК состав отдельных классов фосфолипидов и гликолипидов. Основными ЖК фосфолипидов тонопласта культивированных клеток *Acer pseudoplatanus* и *Vigna radiate* были пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая ЖК (Yoshida et al., 1986; Tavernier et al., 1993). Степень ненасыщенности ЖК у фосфолипидов тонопласта *Vigna radiate* была ниже, чем у плазматических мембран. Состав ЖК фосфатидной кислоты в тонопласте сильно отличался от состава других фосфолипидов содержанием относительно большого количества C20:2 ЖК (11,2%) (Yoshida et al., 1986). Гликолипиды тонопласта клеток мезофилла *Avena sativa* в меньшей степени обогащены пальмитиновой ЖК в отличии от фосфолипидов (Verhoek et al., 1983).

1.3.2. Нейтральные липиды

Фракция нейтральных липидов (НЛ) может включать в себя липиды ацильной природы (ЖК, жирные спирты и др.); глицеролипиды (глицериды) – моноацил, диацил и триацилглицерины; стероидные липиды; свободные углеводороды (Кейтс, 1975; Акмурзина и др., 2012).

Моно- и диацилглицерины (ДАГ) выступают предшественниками в синтезе триацилглицеринов (ТАГ) (рис. 3). ДАГ представляет собой важную точку разветвления между накоплением и синтезом липидов мембраны. ДАГ выступают в качестве субстрата для биосинтеза фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов по одному пути и гликоглицеролипидов – по другому. ТАГ представляют собой компактную молекулу для хранения энергии и углерода в организмах. Поэтому ТАГ в большом количестве содержатся в семенах, этиолированных проростках, но также накапливаются в стареющих листьях, пыльце. ТАГ синтезируется из ДАГ двумя взаимодополняющими реакциями, ацил-КоА-зависимой и ацил-КоА-независимой реакцией (Zhang et al., 2009).

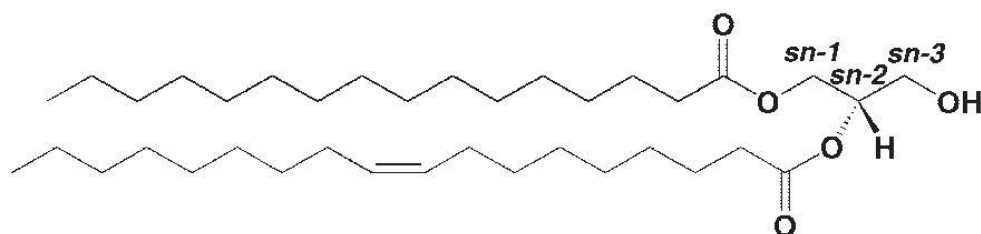


Рис. 3. Общая формула глицеролипидов (глицеридов) (Fahy et al., 2011)

Стерины (СТ), в растениях известные как фитостерины, являются изопреноидными производными и неотъемлемыми компонентами липидного бислоя мембраны (рис. 4).

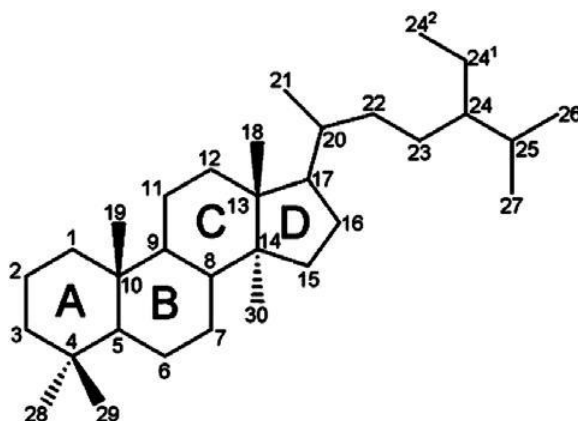


Рис. 4. Общая структурная формула стерина. Кольца А, В и С – гидрированный фенантрен, D кольцо – цикlopентан (Валитова и др., 2016)

Стерины в растениях присутствуют в свободном состоянии (свободные СТ), в сопряжении с высшими жирными кислотами (стериновые эфиры), а также в конъюгированных формах в виде стерилгликозидов и ацилстерилгликозидов, углеводных производных стеринов (Ferrer et al., 2017). Каждый вид растений имеет свое собственное характерное распределение фитостеринов, при этом наиболее распространенными СТ в природе являются β -ситостерин, кампестерин и стигмастерин (Валитова и др., 2016). Растения также содержат относительно небольшое количество холестерина (около 1% от общего количества СТ), обычно в несколько сотен или тысяч раз меньше, чем в животных. Холестерин входит в состав мембранных липидов и липидов листовой поверхности, производное холестерина 7-дегидрохолестерин является ключевым предшественником для биосинтеза витамина D₃. Холестерин также является предшественником таких метаболитов как стероидные гликоалкалоиды и фитоэкдистероиды (Sonawane et al., 2016).

В зависимости от содержания различных алкильных групп при 24-м атоме углерода стеринны делят на 24-метилстеринны и 24-этилстеринны. В то время как кампестерин и β -ситостерин имеют метильную и этильную группы соответственно, стигмастерин, кроме этильной группы при C24, имеет дополнительную двойную связь при C-22 атоме в отличии от β -ситостерина (Moreau et al., 2018).

Синтез фитостеринов происходит в ЭПР и состоит из трех этапов. Первый этап – это мевалонатный путь, превращение ацетил-КоА в мевалонат и сквален. Второй этап – это циклизация сквалена с помощью скваленэпоксидазы с образованием циклических тритерпеновых скелетов и генерации циклоартенола и ланостерина. В основном фитостеринны, в том числе мембранные, синтезируются из циклоартенола, но в связи с тем что ген ланостеринсинтазы был найден в нескольких видах растений, то был предположен путь синтеза растительных стеринов через ланостерин (Sonawane et al., 2016). Эксперименты на проростках *Arabidopsis thaliana* с помощью

методов ЯМР показали, что небольшое количество ситостерина образуется из ланостерина (Ohyama et al., 2009). Вероятно, ланостерин может продуцировать небольшое количество СТ в качестве дополнительного пути и такой путь синтеза СТ может иметь отношение к ответной реакции растений на стрессовые воздействия (Zhang et al., 2020). И третий этап – это синтез холестерина с помощью SSR2 (редуктаза боковой цепи 2) по одному пути и 24-алкилстеринов с помощью SMT1 (стерин-С24-метилтрансфераза – по другому. Ниже по ходу пути синтеза фитостеринов точка ветвления 24-метиленлофенола и 24-этилиденлофенола направляет метаболический поток либо к кампестерину, а затем к брассиностероидам, либо к 24-этилстеролам, ситостерину и стигмастерину. Эта точка ветвления способствует установлению соотношения содержания кампестерина к содержанию ситостерина в качестве характерного признака растений (Rogowska and Szakiel, 2020).

В составе НЛ тонопласта *Beta vulgaris* идентифицированы моно-, ди- и триацилглицериды, СТ (табл. 2), эфиры СТ и свободные углеводороды.

Таблица 2

Состав стеринов вакуолярных мембран (% от общего количества липидов)

Липиды	<i>Vigna radiata</i> L. ¹	<i>Acer pseudoplatanus</i> L. ²	<i>Oryza sativa</i> L. ³	<i>Avena sativa</i> L. ⁴
Ацилстерилглицозиды	7,4	10,9	20	13,2
Стерилглицозиды	2,3	12,2	1,3	7,8
Свободные стерины	18,2	5,1	6,0	-
Эфиры стеринов	-	2,6	-	-

Примечание: 1 – Yoshida and Uemura, 1986; 2 – Tavernier et al., 1993; 3 – Yamaguchi et al., 2001; 4 – Verhoek et al., 1983.

Присутствовало также небольшое количество ЖК и α -токоферола (Макаренко и др., 1992). В тонопласте *Acer pseudoplatanus* в составе нейтральных липидов было следующее распределение отдельных классов

липидов: свободные СТ – 29,6% от общего количества НЛ, эфиры СТ – 17,2%, моноацилглицериды – 3%, диацилглицериды – 5,5%, триацилглицериды – 20,5%, свободные ЖК – 12,2%, метиловые эфиры ЖК – 2,7% (Tavernier et al., 1993).

1.3.3. Полярные липиды

Полярные липиды (ПЛ) обычно делят на два основных класса: фосфолипиды (ФЛ) и гликоглицеролипиды (гликолипиды) (ГЛ). Все ФЛ в зависимости от входящего в их состав полиола целесообразно разделить на глицерофосфолипиды (фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозиты, фосфатидная кислота) (рис. 5), диольные ФЛ и сфингофосфолипиды (сфингомиелины). В состав фосфолипидов входят также глицерин, жирные кислоты, альдегиды и азотистые соединения (холин, этаноламин, серин).

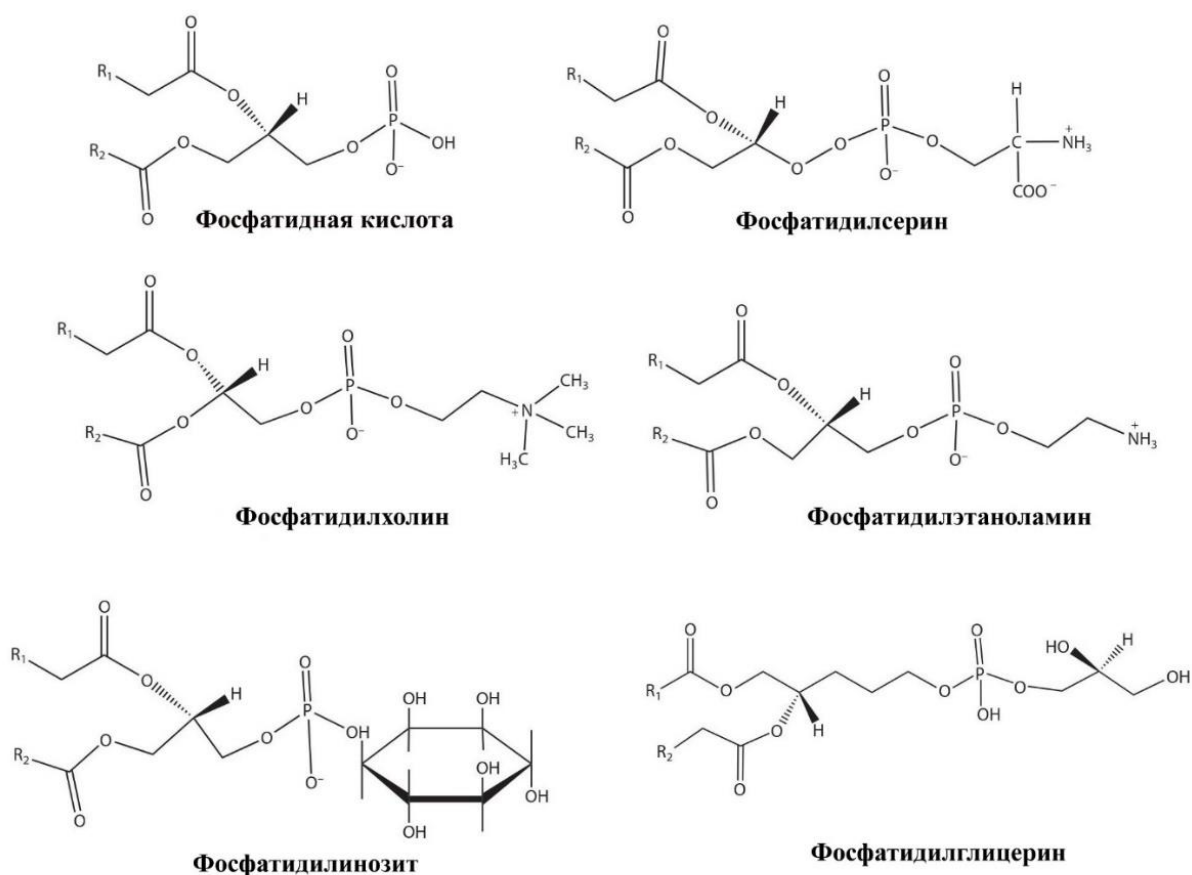


Рис. 5. Структурная формула фосфолипидов (Lim et al., 2017)

Глицерофосфолипиды состоят из глицеринового остова, этерифицированного двумя жирными кислотами в положениях *sn-1* и *sn-2* и содержат в полярной головке фосфатную группу (Michaud et al., 2017). К гидроксилу фосфорной кислоты сложноэфирной связью присоединен радикал (серин, холин, глицерин, инозит и др.) и два ацильных остатка жирных кислот, содержащих от 12 до 18 атомов углерода.

В названиях ФЛ, потерявших одну из двух ацильных цепей, используется приставка «лизо». Лизофосфолипиды обнаруживаются в мембранах в небольших количествах – появление этих веществ приводит к нарушению структуры бислоя и лизису клеток (Болдырев и др., 2006).

Гликоглицеролипиды можно поделить на гликозилглицерины (МГДГ, ДГДГ, СХДГ) (рис. 6) и гликофинголипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды, глобозиды). Под общим названием ГЛ объединяют различные липидные производные сахаров.

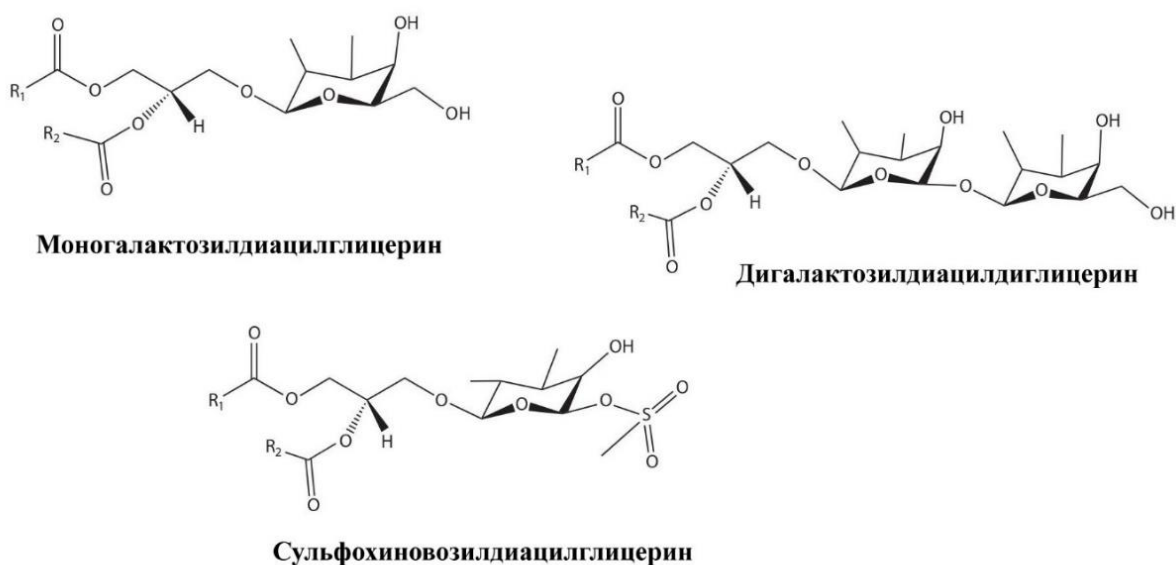


Рис. 6. Структурная формула гликоглицеролипидов (Lim et al., 2017)

Гликоглицеролипиды – это гликозильные производные церамида, представлены цереброзидами, сульфатидами и ганглиозидами. В зависимости от длины и строения углеводной различают цереброзиды, содержащие моно-

или олигосахаридный остаток, и ганглиозиды, к ОН-группе, которых присоединен сложный, разветвленный олигосахарид, содержащий N-ацетилнейраминовую кислоту (Болдырев и др., 2006). В растениях чаще всего встречаются моногалактозилдиацилглицерины (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерины (ДГДГ) (Васьковский, 1997).

Растения продуцируют полярные липиды через эукариотический путь (путь Кеннеди) и пластидный путь (рис. 7). Гликоглицеролипиды (МГДГ, ДГДГ и СХДГ) синтезируются только в пластидах, однако при синтезе МГДГ также может использоваться фосфатидилхолин из эукариотического пути (Slack et al., 1977).

Биосинтез полярных липидов начинается с образования фосфатидной кислоты. Фосфатидная кислота может быть преобразована в ДАГ или цитидиндифосфат-ДАГ (ЦДФ-ДАГ). Гликоглицеролипиды синтезируются из ДАГ, а ФГ из ЦДФ-ДАГ в пластидах. В мембране ЭПР из ЦДФ-ДАГ синтезируется ФГ, но также и ФИ. ФХ и ФЭ производятся из ДАГ с использованием цитидиндифосфохолин и цитидиндифосфэтаноламин соответственно, а ФС производится из ФЭ с помощью реакции обмена оснований (Yamaoka et al., 2011).

В составе полярных липидов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* присутствовали ФЛ (табл. 3) и гликоглицеролипиды. Преобладали фосфатидилхолины (ФХ) и фосфатидилэтаноламины (ФЭ), составляющие в сумме 78% (Marty, Branton, 1980). Содержание фосфатидилсеринов (ФС), фосфатидилглицеринов (ФГ) и фосфатидной кислоты (ФК) самое низкое в тонопласте. В составе ФЛ тонопласта также присутствовали дифосфатидилглицерины (2,4%). Примечательно, что в составе липидов вакуолей и тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* отсутствовали лизоформы фосфолипидов (Макаренко и др., 1992).

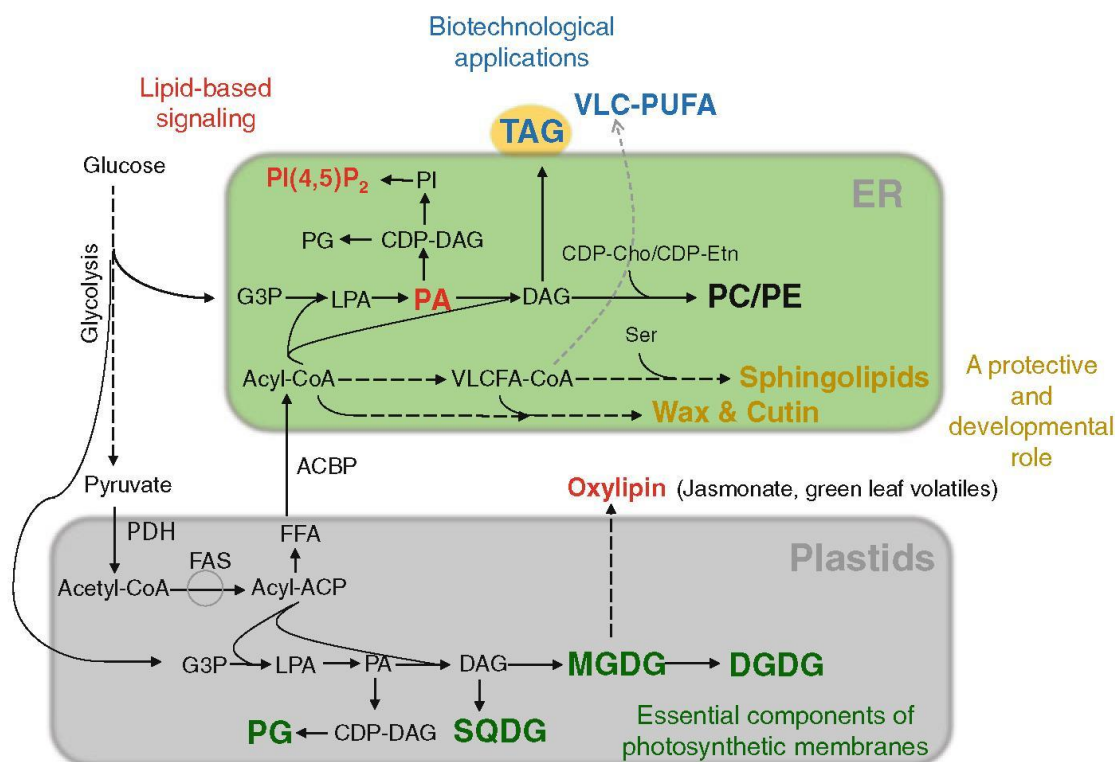


Рис. 7. Упрощенный взгляд на биосинтез липидов в зеленых фотосинтетических клетках (Li-Beisson et al., 2016)

Обозначения: ER – эндоплазматический ретикулум, plastids – пластиды, glucose – глюкоза, glycolysis – гликолиз, pyruvate – пируват, PDH – пируватдегидрогеназа, acetyl-CoA – ацетил-КоА, FAS – синтаза жирных кислот, acyl-ACP – ацил-АПБ, G3P – глицерин-3-фосфат, LPA – лизофосфатидная кислота, PA – фосфатидная кислота, DAG – диацилглицерин, MGDG – моногалактозилдиацилглицерины, DGDG – дигалактозилдиацилглицерины, CDP-DAG – цитидиндифосфат диацилглицерин, PG – фосфатидилглицерины, SQDG – сульфохиновозилдиацилглицерины, FFA – свободные жирные кислоты, ACPB – ацил-КоА-связывающий белок, acyl-CoA – ацил-КоА, VLCFA-CoA – ацил-КоА-синтетаза жирных кислот с длинной цепью, PI – фосфатидилинозиты, PI(4,5)P₂ – фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат, CDP-Cho/CDP-Etn – цитидиндифосфат холин/цитидиндифосфат этаноламин, PC/PE – фосфатидилхолины /фосфатидилэтаноламины, TAG – триацилглицерины, VLC-PUFA – полиненасыщенные жирные кислоты с длинной цепью (>20C), oxylin (jasmonate, green leaf volatiles) – оксилипин (жасмонат, летучие вещества зеленых листьев), sphingolipids – сфинголипиды, wax and cutin – воска и кутин, essential components of photosynthetic membranes – основные компоненты фотосинтетических мембран, a protective and developmental role – роль в защите и развитии, lipid-based signaling – липидный сигналинг, biotechnological applications – биотехнологическое применение.

Количество ГЛ, а именно МГДГ, ДГДГ и сульфохиновозилдиацилглицерины (СХДГ), в большом количестве были обнаружены в тонопласте протопластов клеток мезофилла листьев *Avena sativa*

– 28,6% от общего количества липидов (Verhoek et al., 1983), в *Kalanchoë daigremontiana* – около 25% (Behzadipour et al., 1998), культивированных клетках *Oryza sativa* МГДГ почти не было, а ДГДГ – 31% (Yamaguchi and Kasamo, 2001). Меньше всего ГЛ зарегистрировано в тонопласте *Vigna radiate* – 4,4% (Yoshida and Uemura, 1986).

Таблица 3

Фосфолипидный состав вакуолярных мембран (% от общего количества ФЛ)

Липиды	<i>Vigna radiate</i> L. ¹	<i>Acer pseudoplatanus</i> L. ²	<i>Beta vulgaris</i> L. ³	<i>Avena sativa</i> L. ⁴	<i>Kalanchoë daigremontiana</i> Ham. et Per. ⁵
ФЭ	31,4	46,7	28,5	20,6	≈ 24,11
ФХ	46,5	30,3	39,5	49,7	≈ 41,13
ЛФХ	-	1,6	-	-	-
ФГ	4,5	2,3	3,1	20,6	≈ 11,3
ДФГ	-	-	2,4	-	-
ФИ	11,2	15,3	12,0	9	≈ 12,8
ФС	4,3	2,5	Следы	-	-
ФК	2,2	1,4	14,6	-	≈ 10,6

Примечание: 1 – Yoshida and Uemura, 1986; 2 – Tavernier et al., 1993; 3 – Макаренко и др., 1992.; 4 – Verhoek et al., 1983, 5 – Behzadipour et al., 1998.

1.4. Влияние абиотических стрессовых воздействия на растения

Окружающая среда постоянно оказывает влияние на живой организм. Традиционно стрессовые воздействия (стрессоры) разделяют на биотические (влияние живых организмов) и абиотические (между организмами и физической средой). Поскольку растения прикреплены к месту обитания, то они периодически подвергаются абиотическим стрессовым воздействиям и вынуждены к ним адаптироваться (Krishania et al., 2013). Абиотические стрессы (высокие и низкие температуры, засуха, наводнение и др.) особенно сильно влияют на рост и урожайность сельскохозяйственных культур.

Термин стресс (от англ. «stress» – напряжение) был предложен ученым-физиологом Гансом Селье в 1936 г. для животных организмов (Selye, 1936). Это совокупность всех неспецифических изменений, возникающих в организме под влиянием неблагоприятных и повреждающих факторов. На основе оригинальной концепции стресса по Селье выделяют три стадии реакции на стресс: первичная стрессовая реакция (начало стресса, катаболические процессы превышают анаболические), стадия сопротивления (адаптация, закаливание), стадия истощения (длительный стресс). Н. К. Lichtenthaler расширил концепцию стресса растений, включив в нее стадию регенерации растений (когда стрессор удален и урон от стресса не был слишком высок) (Lichtenthaler, 1998). Самые разнообразные неблагоприятные факторы могут действовать длительное время или оказывать сравнительно кратковременное, но сильное влияние. В первом случае, как правило, в большей степени проявляются специфические механизмы устойчивости, во втором – неспецифические (Чудинова и Орлова, 2006). К неспецифическим процессам, происходящим в клетках растений, относят те ответные реакции, которые наблюдаются при любых стрессовых воздействиях. К специфическим относят реакции, качественно отличающиеся в зависимости от воздействующего фактора и генотипа растений (Пятыгин, 2008).

Повреждение клеточных мембран, изменения ферментативных процессов и последующие отклонения в клеточных структурах и метаболизме являются первичными реакциями растительной клетки. Длительность протекания биохимических реакций и изменения в растениях зависит от количественного и качественного характера стрессора. Устойчивость организма к стрессору и его дальнейшее развитие определяется степенью и видом этих реакций (Wang, 2003). На рисунке 8 приведены основные защитные механизмы растений против абиотических стрессов: кутикула как внешний щит, ненасыщенные жирные кислоты как мембранный модулятор и предшественник оксипинов, ферменты антиоксидантной системы, шапероны и осмопротекторы. При

стрессовом воздействии сигнальные молекулы мобилизуют нижестоящие эффекторы, в первую очередь протеинкиназы и факторы транскрипции, что приводит к изменению экспрессии генов и активности белков-ферментов, тем самым запуская защитные системы (He et al., 2018). Липиды являются неотъемлемым компонентом мембран, а также некоторые липиды выступают как сигнальные молекулы (фосфатидилинозиты, фосфатидная кислота), поэтому можно сказать, что липиды выполняют важную роль в защите растений при абиотических стрессах.

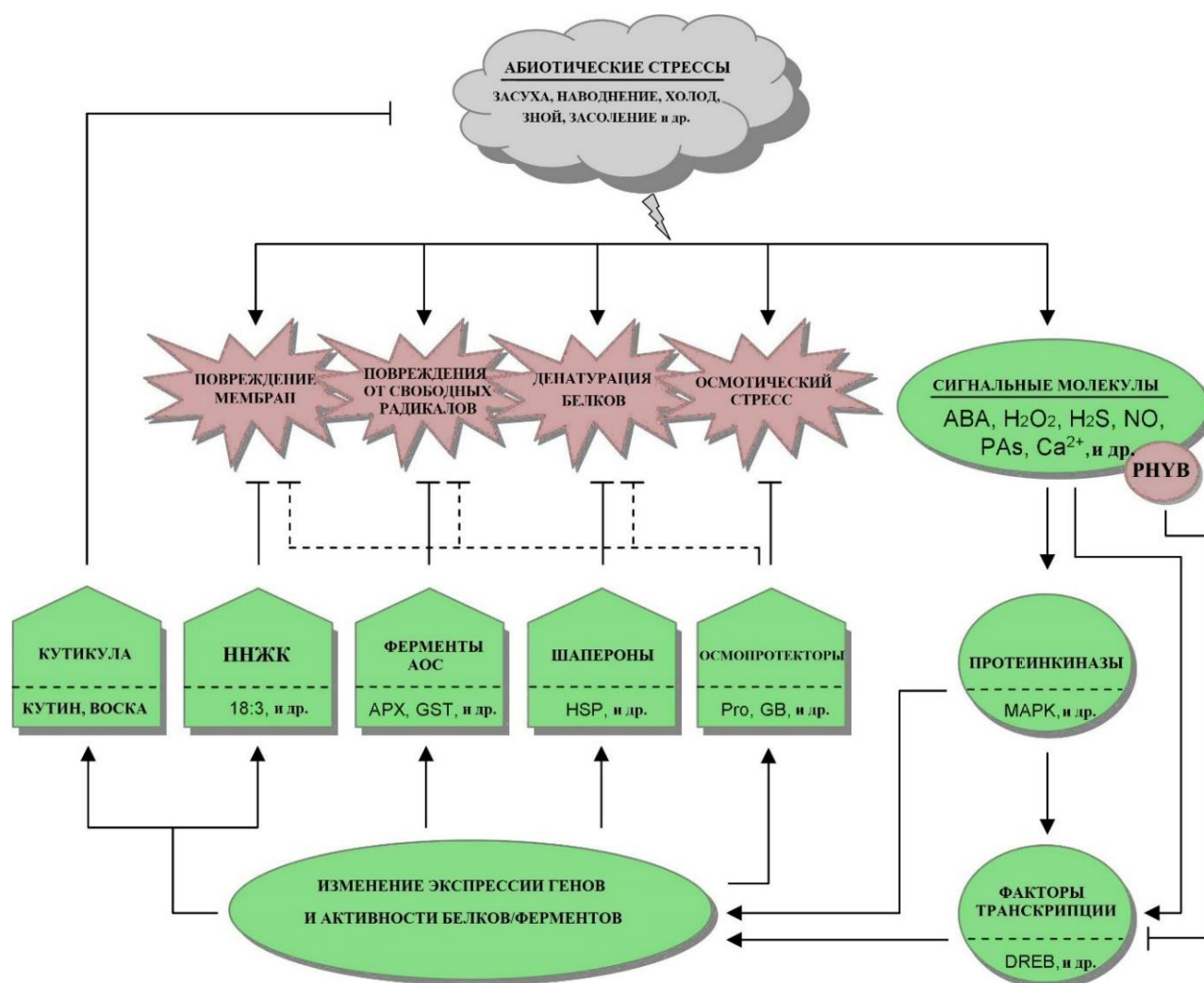


Рис. 8. Основные системы защиты растений и их регуляция при абиотических воздействиях (He et al., 2018)

Обозначения: ABA – абцизовая кислота, ФНУВ – фитохром В, APX, аскорбатпероксидаза, GST – глутатион-S-трансфераза, HSP – белок теплового шока, Pro – пролин, GB – глицин бетаин, PAs – полиамины, MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа, DREB – белок, связывающий элемент, реагирующий на дегидратацию, АОС – антиоксидантная система, ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты.

1.4.1. Окислительное стрессовое воздействие и изменение мембранных липидов

Окислительное стрессовое воздействие – это процесс повреждения клетки в результате окисления. Он индуцирует обратимые или необратимые модификации белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов. Более того, повреждая мембраны, перекисное окисление липидов (ПОЛ) нарушает их барьерную функцию, и клеточные органеллы распадаются (Moller et al., 2007). Для защиты от окислительного стресса в клетках функционирует антиоксидантная система.

В растениях постоянно образуются активные формы кислорода (АФК) в процессе клеточного дыхания (супероксид радикал, гидроксил-радикал, синглетный кислород и перекись водорода) как побочные продукты метаболических путей, которые поглощаются различными компонентами антиоксидантной системы. Окислительный стресс сопровождает практически все биотические и абиотические стрессовые воздействия на растения и является одним из самых ранних ответов на стресс (Hernandes et al., 2001). Растения, проявляющие различную чувствительность к абиотическим стрессам, демонстрируют различную степень окисления липидов и белков.

Основными причинами окислительного стресса являются: 1) развитие дисбаланса между производством АФК и детоксикацией из-за нарушения клеточного гомеостаза в клетке; 2) производство АФК специальными ферментами в качестве составной части стресс-сигнализации и иммунного ответа. Эти механизмы могут возникать одновременно, поскольку стрессовые воздействия индуцируют дополнительное производство АФК через активацию НАДФН-оксидаз и пероксидаз клеточной стенки (Креславский и др., 2012; Cui et al., 2012).

Установлено, что кислород и его активные формы более растворимы в жидком липидном бислое, чем в водном растворе. Следовательно, мембранные липиды, в основном фосфолипиды, становятся основными мишенями

окислительного повреждения. Особенно чувствительны полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов, так как легче атакуются АФК, чем ацильные цепи жирных кислот без двойных либо с одной двойной связью. Высокая концентрация полиненасыщенных жирных кислот (ПННЖК) в фосфолипидах клеточной мембраны не только делает их главными мишенями для реакции с АФК, но также позволяет им участвовать в длительных цепных реакциях ПОЛ (Naudi et al., 2013). Перекисное окисление липидов усугубляется за счет образования липидных радикалов, которые сами могут реагировать и повреждать белки и ДНК (Sharma et al., 2012). Поэтому ПОЛ рассматривают как признак окислительного стресса и индикатора повреждения клеточных мембран.

ПОЛ обычно включает этапы: инициирование цепной реакции, распространение и прекращение (Catala et al., 2006). На стадии инициации ПОЛ прооксиданты отщепляют аллильный водород, образуя липидный радикал, который стремится стабилизироваться путем образования сопряженного диена. В фазе распространения липидный радикал быстро реагирует с кислородом с образованием липидного пероксирадикала, который удаляет водород от другой липидной молекулы, образуя новый липидный радикал и гидропероксид липида. Новый липидный радикал продолжает стадию распространения. В реакции обрыва антиоксиданты отдают атом водорода перекисным радикалам липидов с образованием нерадикальных продуктов (Ayala et al., 2014). Однако не всегда ПОЛ оказывает негативное воздействие на растительный организм. Например, оксилипины, которые образуются в результате окисления и дальнейшего превращения ПННЖК, обладают антимикробным эффектом, стимулируют экспрессию защитных генов и регулируют гибель растительных клеток (Prost et al., 2005). Во время болезни растения или стрессового воздействия на него, повышается количество АФК. Триеновые жирные кислоты особенно чувствительны к неферментативному окислению активными формами кислорода. ПОЛ в таких условиях жизненно важно для растений как способ

удаления АФК, а также является обычным и постоянным биологическим процессом (Mene-Saffrane et al., 2009).

Интересно, что окисление липидов, инициированное АФК, может протекать не только в гидрофобной части липидов, которое вызывает ПОЛ, но и в гидрофильной части, вызывая свободнорадикальную фрагментацию. Свободнорадикальная фрагментация типична для липидов, содержащих гидроксильную группу в β -положении по отношению к сложноэфирной или амидной связи. Гидроксилсодержащие сфинголипиды и глицеролипиды проявляют в модельных мембранах, инкубируемых в окислительно-восстановительных системах, антиоксидантные свойства. А отсутствие ОН групп в структуре липидов имеет либо прооксидантный, либо нейтральный эффект. Моноацилглицерины замедляли скорость как ПОЛ в гидрофобной части, так и скорость свободнорадикальной фрагментации в гидрофильной части фосфолипидной мембраны. Авторами исследования (Olshyk et al., 2014) были сделаны выводы, что способность гидроксилсодержащих липидов к свободнорадикальной фрагментации в полярной части липидов, по-видимому, является механизмом их защитного действия. В исследовании Sankhagowit et al. (2016) было продемонстрировано, что молекулярные изменения, возникающие в результате окисления фосфатидилэтаноламинов, приводят к резким изменениям фазового поведения липидных мембран. В нормальных физиологических условиях ФЭ образует гексагональную фазу типа II, но окисление липидной молекулы изменяет соотношение между площадями ее головной и хвостовой групп за счет гидрофобных фрагментов в полярной части липида, приводя к образованию трехмерной кубической фазы.

АФК могут выступать как в роли инициатора окислительного стресса, так и являться сигнальными молекулами, которые вызывают реакции, способствующие формированию адаптационных механизмов при стрессовом воздействии. Во время абиотического стресса генерация АФК происходит в основном в местах транспорта электронов – митохондриях и хлоропластах.

Согласно выводам Choudhury et al. (2016), АФК являются полезными для растений и участвуют в регуляции метаболизма до тех пор, пока клетки поддерживают детоксикацию АФК во время абиотического стресса. До определенного уровня накопление АФК во время засухи могут работать как стимулирующие молекулы в сигнальном пути, действуя как вторичный посредник (Nalina et al., 2021). На растениях дикого типа *Arabidopsis thaliana* было показано, что перекись водорода активирует фосфолипазу D, которая стимулирует гидролиз липидов и продукцию ФК. ФК может связываться с белками-мишенями, приводя к активации MAPK каскада и снижению запрограммированной гибели клеток. Мутантные растения с выключенным геном PLD δ , который вызывает олеат-активированную активность фосфолипазы D, при обработке перекисью водорода проявляли повышенную чувствительность к стрессовому воздействию (Zhang et al., 2003). Однако, активность фосфолипазы D, вызванная геном PLD α , предположительно необходима для накопления АФК (Sang et al., 2001).

Мутантные растения *Triticum aestivum* со сверхэкспрессией белка WHEAT KINASE START1 (WKS1) показали устойчивость к грибковому заболеванию *Puccinia striiformis*. Связывание домена START WKS1 белка с фосфатидной кислотой или полифосфатидилинозитами активирует белок WKS1, который импортируется в хлоропласт, где фосфорилирует акорбатпероксидазу, тем самым снижая детоксикацию АФК, способствуя гибели клеток и частичной устойчивости к грибковому заболеванию (Gou et al., 2015).

1.4.2. Гиперосмотическое стрессовое воздействие и изменение мембранных липидов

Гиперосмотическое стрессовое воздействие (более высокая осмолярность окружающей среды, чем осмолярность внутри клетки) на растения является неизбежным фактором, с которым сталкиваются растения, так как может возникать из-за перепадов температуры, интенсивности света и малого

количества осадков. В условиях умеренной засухи фотосинтетическая способность растений в основном не претерпевает никаких изменений. Но в условиях сильной засухи в растениях происходят процессы, приводящие к торможению фотосинтеза и роста. Справляясь с дефицитом воды, растения развивают различные сложные механизмы устойчивости и адаптации (Krishania et al., 2013; Seleiman et al., 2021).

Способы приспособления растений к засухе:

а) предотвращение обезвоживания за счет развития разветвленной глубокой корневой системы для поглощения воды и закрытия устьиц или непроницаемой кутикулы листа для уменьшения транспирации, что поддерживает водный потенциал на высоком уровне;

б) адаптация к гиперосмотическому воздействию – жизнедеятельность растения при низком водном статусе с помощью снижения водного потенциала за счет накопления внутриклеточных осмолитов, сахаров, органических кислот, аминокислот и неорганических ионов, что приводит к увеличению концентрации клеточной жидкости. Основная функция клеточной жидкости – поддерживать тургор клеток, уравнивать инфильтрацию протоплазмы и внешней среды и обеспечивать нормальное протекание различных физиологических процессов в клетках. Происходит также синтез стресс-чувствительных белков и факторов транскрипции;

в) спасение от засухи (растения избегают засухи, завершая жизненные циклы до наступления засушливых периодов) (Luo, 2010; Pietuch et al., 2013; Dawood and Abeed, 2020).

Гиперосмотический стресс возникает не только при недостатке воды, но и при воздействии NaCl, так как засоление почвы не позволяет растению впитывать воду из почвы (van Zelm et al., 2020). Обычно, когда содержание воды в растении уменьшается, его клетки сокращаются, а клеточные стенки расслабляются. Это приводит к снижению тургорного давления и

последующему росту концентрации растворенных веществ в клетках. Гиперосмотическое стрессовое воздействие приводит к повышенному натяжению плазматической мембраны, так как плазмалемма и клеточная стенка в нескольких местах связаны нитями Гехта. Натяжение мембраны активирует кальциевый канал OSCA1, способствуя притоку ионов кальция и вызывая последующий сигнальный каскад (Yuan et al., 2014). Были исследованы и другие сенсоры гиперосмотического воздействия – рецептор-подобные киназы (Haswell and Verslues, 2015) и двухкомпонентная система, у которой домен сигнальной киназы, находящийся на мембране, присоединен к гистидинкиназе и осуществляет передачу сигнала посредством фосфорилирования регулятора ответа (Singh et al., 2015).

Кроме того, дефицит воды прерывает перенос электронов во время фотосинтеза, увеличивая производство АФК и активацию гидролитических ферментов, и тем самым инициируя повреждение ключевых биологических молекул, особенно белков, нуклеиновых кислот и мембранных липидов. Повышенная потеря электролитов в клетках растений, вызванная гиперосмотическим стрессовым воздействием, была обнаружена во многих растениях. С повышением степени и времени стрессового воздействия от недостатка воды, утечка электролитов в листьях суккулентного растения *Phedimus aizoon* увеличивалась, что связывалось с перекисным окислением липидов (возрастало содержание малонового диальдегида (МДА)), липолизом и ингибированием путей биосинтеза липидов (Liu et al., 2021).

В мембранах засухоустойчивых растений наблюдалось увеличение степени ненасыщенности липидов, которая повышает текучесть и поддерживает целостность мембран (Guerfel et al., 2008; Toumi et al., 2008; Gasulla et al., 2013; Perlikowski et al., 2016). Абсолютное содержание многих липидов у чувствительных к стрессу растений в основном снижалось после стрессового воздействия, но соотношение разных липидов различалось (Guerfel et al., 2008; Tshabuse et al., 2018; Wang et al., 2020). Гиперосмотический стресс

по-разному влияет на метаболизм мембранных липидов в зависимости от вида растений, интенсивности стресса и т. д. Впоследствии стресса активируются фосфолипазы, которые гидролизуют фосфолипиды (Hong et al., 2016). Однако у засухоустойчивых растений отмечалась значительная связь между стабильностью клеточных мембран и высоким содержанием некоторых глицеролипидов. Например, у *Craterostigma plantagineum* при засухе в течение 14 дней увеличивались ФХ, ФЭ, ФС и ФИ (Gasulla et al., 2013). Интересные результаты показало исследование на трансгенных растениях табака со сверхэкспрессией гена ZmPIS, ответственного за синтез фосфатидилинозитолсинтазы. В таких растениях при гиперосмотических условиях значительно увеличивались уровни всех классов полярных липидов, особенно МГДГ, ДГДГ, ФЭ, ФИ и ФА с ненасыщенными жирными кислотами (Zhai et al., 2012).

Было показано, что при засухе может увеличиться экспрессия генов МГДГ- и ДГДГ-синтаз, приводя к повышению уровня ДГДГ, в то время как содержание МГДГ оставалось на уровне контроля. Стимуляция экспрессии гена МГДГ-синтазы не обязательно приводит к накоплению МГДГ, так как для синтеза ДГДГ необходим вновь синтезированный МГДГ. В результате увеличившееся соотношение ДГДГ/МГДГ может способствовать поддержанию ламеллярных двухслойных структур, потому как ДГДГ представляет собой двухслойный липид, тогда как МГДГ из-за своей конической молекулярной формы имеет склонность к образованию неламеллярных гексагональных структур (Torres-Franklin et al., 2007).

Изучение воздействия засухи на устойчивые и неустойчивые сорта риса показало, что количество свободных стеринов и эфиров стеринов, а также активность HMG-CoA – редуктазы (фермент синтеза стеринов на этапе образования мевалоновой кислоты) увеличивались пропорционально тяжести стрессового воздействия в листьях растений устойчивых к стрессу (Kumar et al., 2015). Засухоустойчивые растения с подавленной экспрессией гена фермента

SMT1 (стерин-С24-метилтрансфераза 1), накапливали больше холестерина, который в свою очередь влиял на рост растений и устойчивость к засухе путем регулирования пути синтеза полиаминов (Chen et al., 2018).

Ввиду того, что некоторые фосфолипиды могут быть либо предшественниками сигналов, либо являться собственно сигнальными молекулами, то такое количество таких липидов может временно увеличиваться при гиперосмотическом стрессовом воздействии. Известно, что ФК, способствует закрытию устьиц за счет связывания и ингибирования протеинфосфатазы ABI1 (Zhang et al., 2004), а также инозитол-1,4,5-трифосфат за счет индуцирования высвобождения ионов кальция (Sanders et al., 1999).

Роль ФК велика также и в поддержании архитектуры корневой системы в различных гиперосмотических условиях. Например, растения с повышенной экспрессией фосфолипазы D, вызванной геном $PLD\alpha3$, показали низкую чувствительность к высокой концентрации соли и недостатку воды. Такие растения имели больше боковых корней и росли лучше, чем растения дикого типа и, тем более, растения с выключенным геном $PLD\alpha3$ (Hong et al., 2008).

1.4.3. Гипоосмотическое стрессовое воздействие и изменение мембранных липидов

Частичное или полное затопление снижает содержание кислорода в почве и способность растения поглощать питательные вещества. Избыток воды – это сложный стресс, при котором возникает гипоксия или аноксия, ограничивается синтез АТФ и углеводных ресурсов, что как правило приводит к серьезным последствиям для роста и выживания растений (Bailey-Serres and Voesenek, 2008).

Во время затопления растения также должны справляться с набуханием клеток (гипоосмотический стресс), но мало что известно о механизмах, с помощью которых это происходит. При отсутствии контроля оптимального объема клетки, пассивная диффузия воды может привести к сильному набуханию, повышенному натяжению мембраны и даже потере клеточной

целостности. Исследования на проростках *Arabidopsis thaliana* показали роль механочувствительного ионного канала MscS-like10 – общего датчика набухания клеток в растительных клетках. Гипоосмотическое стрессовое воздействие на клетки трансгенных растений вызывало временное повышение цитоплазматического кальция (первые несколько секунд), накопление АФК (в течение 30 мин), экспрессию механоиндуцируемых генов и запрограммированную гибель клеток (апоптоз) (Basu and Haswell, 2020).

Воздействие гипоосмотического стресса на липидный профиль изучалось на одноклеточной водоросли *Dunaliella salina*. Было показано, что после гипоосмотического шока происходил быстрый распад полифосфатидилинозитов через активацию фосфолипазы C, который сопровождался резким повышением уровня фосфатидной кислоты (Einspahr et al., 1988). При гипоосмотическом воздействии в первые 30 секунд происходил рост ДАГ на 40% в плазмалемме *Dunaliella salina*, поэтому ДАГ рассматривают как потенциальный вторичный мессенджер в передаче сигнала, опосредованной фосфолипазой C (Ha and Thompson, 1991).

Похожие результаты были получены и в исследованиях Zonia and Munnik (2004), где было показано, что при гипоосмотическом стрессовом воздействии на клетки пыльцевой трубки табака происходит быстрое увеличение содержания ФК и уменьшение – ФИ (в два раза). Однако исследователи предположили, что большая часть ФК при данном стрессе производится с помощью фосфолипазы D, потому что количество фосфатидилбутанола – маркера активности фосфолипазы D увеличивался в среднем в восемь раз. В *Saccharomyces cerevisiae* кратковременный гипоосмотический стресс тоже вызывал быстрый гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата, который катализируется фосфолипазой Plc1p и не зависит от внеклеточного кальция (Perera et al., 2004). Результаты исследования гипоосмотического воздействия на культуру клеток человеческой эмбриональной почки показали, что фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат необходим как для ответа на стресс, так и

для активации рецепторов, связанных с фосфолипазой C, которая, в свою очередь, связана с катионными каналами транзиторного рецепторного потенциала (TRPC5) (Gomis et al., 2008).

Выявлено, что сфингозин-1-фосфат и лизофосфатидная кислота при гипоосмотическом стрессе способствуют высвобождению таурина – органического осмолита за счет, возможно, открытия анионного канала. Эти липиды влияют на кровеносные сосуды через рецепторы, связанные с G-белком (Tachikawa et al., 2009).

1.5. Роль липидов в защите от абиотических стрессовых воздействий

Биофизические свойства липидов были давно охарактеризованы благодаря исследованиям *in vitro* с использованием неприродных липидных молекул (Mason, 1998). Различают четыре фазы состояния липидов в бислоях: ламеллярная жидкокристаллическая фаза, ламеллярная гель-фаза, гексагональная фаза I и гексагональная фаза II (рис. 9). Липиды в мембранах живых организмов в норме находятся в ламеллярном жидкокристаллическом состоянии. Живые организмы адаптируют состав жирных кислот к условиям окружающей среды, предотвращая образование гелевых фаз.

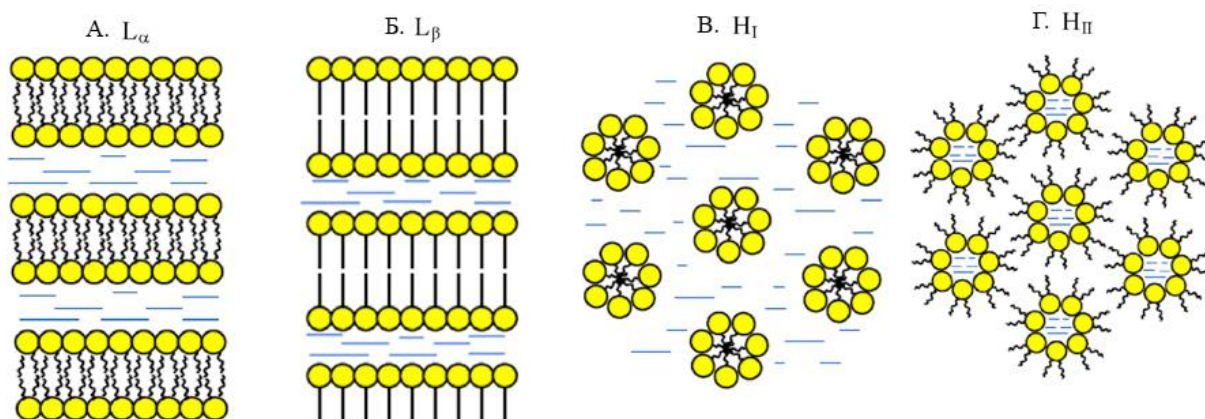


Рис. 9. Схематическое изображение различных фаз водно-липидных систем: А – ламеллярная жидкокристаллическая фаза, Б – ламеллярная гель-фаза, В – гексагональная фаза типа I, Г – гексагональная фаза типа II (Филиппов и др., 2006)

Липиды характеризуются активным вращением атомов углерода по связи С-С цепей ЖК и латеральной диффузией непосредственно молекул фосфолипидов внутри мембраны. ЖК по-разному влияют на физико-химические свойства мембран. ПННЖК обладают хорошей структурной гибкостью (рис. 10), именно такие ЖК увеличивают текучесть мембраны. Добавление в культивируемые клетки физиологически значимых концентраций омега-3 докозагексаеновой (C22:6) ПННЖК приводило к ее включению в состав липидов и последующей перестройке мембраны, стабилизирующей мембранные домены за счет увеличения разницы в порядке между рафтовыми и нерафтовыми областями (Levental and Veatch, 2016).

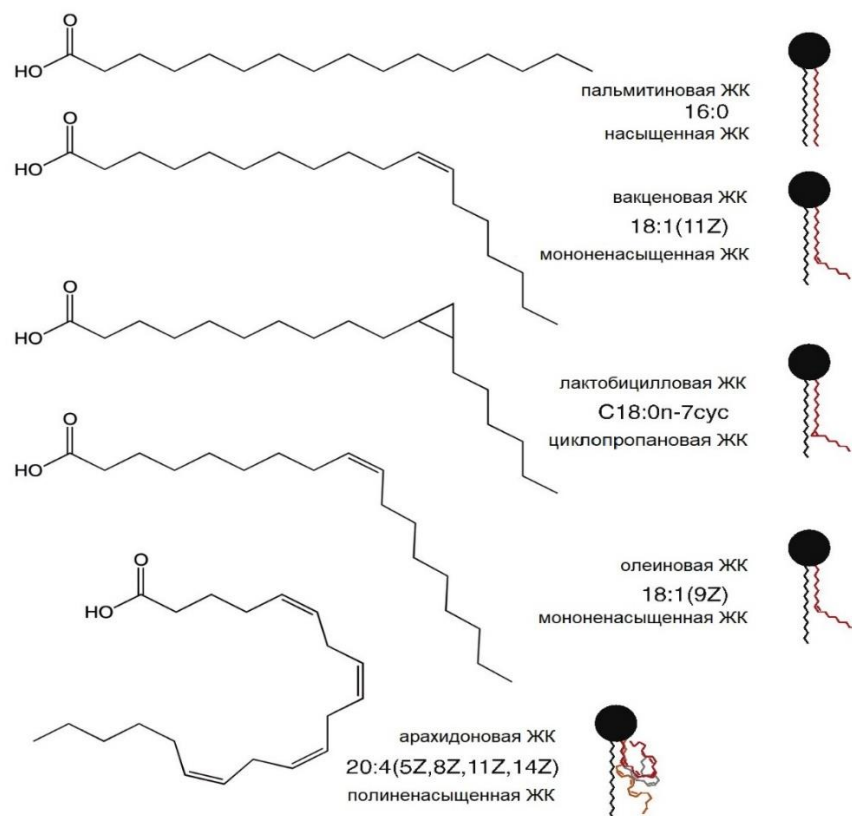


Рис. 10. Разнообразие ЖК в липидах (Ernst et al., 2016)

В биологии часто используется термин «текучесть», который относится к вязкости двухслойного липидного бислоя клеточной мембраны. Вязкость, как свойство жидкости, является внутренним трением вследствие когезионных сил между молекулами (Lee et al., 1989). В липидных бислоях можно определить

взаимосвязь между текучестью и вязкостью, которые являются динамическими параметрами. При переходе мембраны из жидкокристаллической фазы в фазу геля (более твердое состояние) микровязкость увеличивается (Болдырев и др., 2006). Вязкость мембран влияет на клеточный гомеостаз и передачу сигналов. С текучестью мембран неразрывно связана и проницаемость мембран. При увеличении текучести мембрана становится более проницаемой для воды и других малых гидрофильных молекул (Нельсон и Кокс, 2014).

Состав липидов в бислое изменяется под воздействием различных физиологических и экологических условий. Исследования с использованием синтетических липидов и модельных мембран при понижении температуры показали, что вязкость липидного бислоя постепенно повышается, ацильные цепи липидов упорядочиваются и принимают транс-конфигурацию, при этом увеличивается толщина бислоя. Некоторые мембранные белки проявляют низкую активность при гелевой фазе. Например, связывание липидов с Ca^{2+} -АТФазой в гелевой фазе в двадцать пять раз слабее, чем жидкокристаллической фазе (Lee, 2003). Увеличение ННЖК липидов при низких температурах снижает температуру перехода в гель фазу и, следовательно, сохраняет необходимую степень вязкости углеводородной части липидного бислоя, препятствуя процессу кристаллизации. Так, в условиях акклиматизации к холоду при 2 °C у *Arabidopsis thaliana* повышалась десатурация мембранных липидов (Uemura et al., 1995). Увеличение ННЖК также наблюдалось в тонопласте культивируемых клеток *Oryza sativa* (Kasamo et al., 1992) и гипокотилеях *Vigna unguiculata* (de Oliveira et al., 2009) при низкотемпературном стрессовом воздействии. Исследования показали, что адаптация к низким температурам вакуолярной мембраны происходит у *Kalanchoë daigremontiana* путем увеличения текучести тонопласта и повышения процентного содержания линоленовой ЖК (C18:3) (Behzadipour et al., 1998).

При высоких температурах растения снижают уровень ненасыщенности липидов в мембранах за счет гидрофобного взаимодействия, при этом

уменьшается толщина бислоя. Во время теплового стресса отмечалось увеличение насыщенных жирных кислот липидов в тканях листьев *Agrostis stolonifera* (Larkindale and Huang, 2004). В первую очередь это было связано с уменьшением линоленовой ЖК и увеличением линолевой и пальмитиновой ЖК. С помощью мутантных линий *Arabidopsis thaliana* была продемонстрирована корреляция между температурой роста и уровнем НЖК, а именно при повышении температуры заметно снижался уровень триеновых ЖК и последовательно увеличивался уровень пальмитиновой и линолевой ЖК (Falcone and Somerville, 2004). При акклиматизации *Kalanchoë daigremontiana* к высокой температуре (34 °C), содержание линолевой ЖК и линоленовой ЖК в липидах тонопласта снизилось с 34 до 22% и с 23 до 18% соответственно. Кроме того, было отмечено небольшое увеличение количества пальмитиновой ЖК и стеариновой ЖК (с 5 до 11%) (Behzadipour et al., 1998). При воздействии NaCl на галофит *Spartina patens* увеличивалось содержание пальмитиновой ЖК, которая необходима для функционирования фотосистемы II, и стеариновой ЖК, тогда как количество ННЖК (транс-гексадеценовая, линолевая, линоленовая) значительно снижалось. Такие изменения в жирнокислотном составе одновременно защищают и стабилизируют фотосистемы при засолении (Duarte et al., 2018).

Полярные липиды являются амфифильными молекулами, которые различаются не только количеством, длиной и наличием двойных связей в ацильных цепях, но и строением полярной головки. Размер полярной головки также влияет на поведение липидов в водных дисперсиях. Липиды, имеющие схожие площади в поперечном сечении полярной и гидрофобной области, выглядят как цилиндры. Они образуют ламеллярные фазы. К ним относят ФХ, ФГ, ФИ, ДГДГ, СХДГ. Липиды с большой полярной частью и с одной ацильной цепью, такие как лизолипиды, имеют молекулярную форму, похожую на перевернутый конус, и вызывают положительную деформацию кривизны в мембранах. Они способствуют образованию гексагональной фазы типа I.

Липиды с небольшой полярной головной группой имеют молекулярную форму, напоминающую усеченный конус, вызывая деформацию отрицательной кривизны. Эти липиды (МГДГ, ФЭ, ДФГ, ФС, ФК) способствуют организации мембран в гексагональную фазу типа II (Jouhet, 2013; Simons and Samraio, 2011). Преобразование липидного бислоя в гексагональные фазы происходит за счет накопленного напряжения. В определенный момент времени накопленное напряжение превышает критическое значение, и зарождается новая фаза липидов, которая освобождает напряженный липид, помещая его в среду с меньшим крутящим моментом (Frolov et al., 2011). Russell (1989) обнаружил, что неламеллярный домен в плазматической мембране вызывает прерывание двухслойной структуры и, следовательно, обеспечивает высокую проницаемость мембраны.

При воздействии стрессовых факторов на растения происходит ремоделирование (перестройка) липидной части мембраны, то есть уменьшается количество одних липидов и увеличивается содержание других (Zheng et al., 2011). Перестройка липидного слоя предотвращает фазовый переход биологических мембран из жидкокристаллической фазы в гексагональную фазу типа II. Повышение отношения ДГДГ к МГДГ и ФХ к ФЭ снижают склонность мембран к образованию небислойных фаз (de Vries et al., 2004; Narayanan et al., 2015). Предварительная обработка проростков *Triticum aestivum* хлоридом холина, ключевого субстрата для синтеза ФХ, улучшала солеустойчивость *Triticum aestivum* (Mansour et al., 1993). Мутантные растения *Arabidopsis thaliana* с пораженным геном, кодирующим дигалактозилдиацилглицеринсинтазу 1, были не способны адаптироваться к высоким температурам (38 °C) в отличие от растений дикого типа, термотолерантных к такой температуре роста (Chen et al., 2006).

Известно, что фосфатидная кислота способствует дестабилизации бислоя мембраны и образованию гексагональной фазы типа II (Cullis et al., 1979). Отмечено, что фосфолипаза D вызывает гидролиз ФХ, и количество ФК

увеличивается в шесть раз при низкотемпературном стрессе у растений дикого типа *Arabidopsis thaliana* по сравнению с растениями с заблокированным геном фосфолипазы D. Такие процессы были также связаны с повреждением мембран и гибелью клеток (Welti et al., 2002).

Изменения липидного состава листьев *Kalanchoë daigremontiana* и плодов *Ananas comosus* были исследованы при температурных стрессах (Behzadipour et al., 1998; Zhou et al., 2014). Отмечено снижение ФХ и ФЭ при низко- и высокотемпературном стрессе, и рост ФК при низкотемпературном стрессовом воздействии. При высокой температуре в вакуолярной мембране листьев *Kalanchoë daigremontiana* увеличивалось содержание гликоглицеролипидов (МГДГ и ДГДГ). Изменения липидного состава тонопласта при температурных сдвигах могут способствовать хорошей адаптации растений к окружающей среде.

Приблизительно третья часть органического фосфата в растениях связана с фосфолипидами (Poirier et al., 1991). При недостатке фосфата растения перестраивают свои мембраны, частично заменяя фосфолипиды гликоглицеролипидами, чтобы сохранить фосфат для других метаболических процессов. В растениях, испытывающих недостаток фосфата, увеличивается экспрессия МГДГ-синтаз. В то же время количество МГДГ не возрастает, так как дополнительно произведенный МГДГ используется в качестве предшественника для синтеза ДГДГ (Kelly et al., 2003). В плазматических мембранах побегов и корней овса, выращенных в растворе без фосфата, до 70% фосфоглицеролипидов заменялось ДГДГ (Andersson et al., 2003).

Фитостерины, как и полярные липиды, участвуют в регуляции проницаемости и текучести мембран. Стерины имеют плоскую структуру и встраиваются между ЖК липидов, причем 3β -ОН группа обращена к гидрофильной части бислоя мембраны. Таким образом, они увеличивают порядок ЖК и толщину мембраны. Стерины влияют на текучесть мембранного бислоя с разной эффективностью. Экспериментально доказано, что стерины

можно расположить по силе конденсации в следующем порядке: стигмастерин < ситостерин < холестерин. Холестерин плотнее всех остальных стерина упорядочивает жирнокислотные цепи в мембране. Дифференциальные эффекты стерина на упаковку липидного бислоя объясняются наличием дополнительной этильной группы в боковой цепи ситостерина, а также двойной связи и этильной группы стигмастерина (рис. 11), которые делают алкильную цепь стерина менее гибкой и, как следствие, влияют на встраивание и размещение этих стерина в липидном бислое, увеличивая текучесть мембраны. Также известно, что конденсирующий эффект холестерина, а значит и остальных стерина, менее выражен в ненасыщенных липидах, чем в насыщенных (Hodzic et al., 2008). При высоких температурах воздуха происходило увеличение количества стерина в зрелых растениях (до 35%), что снижало текучесть мембраны. Исследователи связывали это с адаптационной ролью стерина при высыхании семян (Roche et al., 2010).

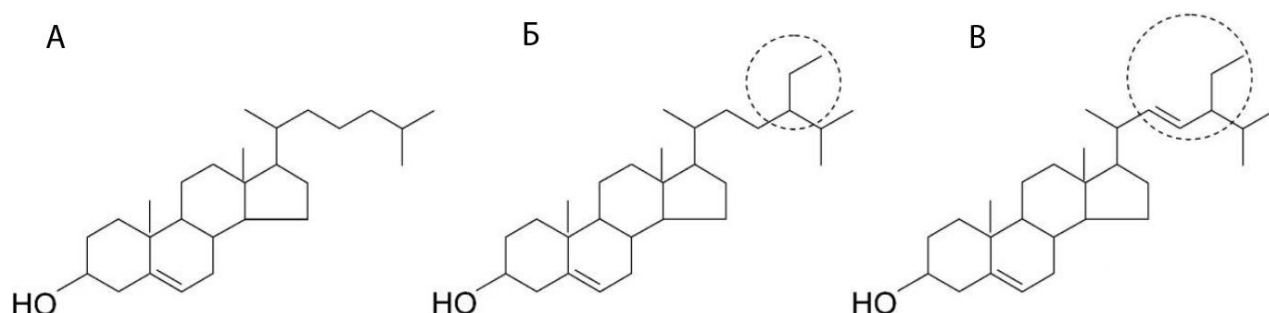


Рис. 11. Структурные формулы холестерина (А), β-ситостерина (Б) и стигмастерина (В). Обведенные области подчеркивают структурные различия стерина (Hodzic et al., 2008)

Кроме структурной роли, некоторые жирные кислоты и липиды могут действовать как сигнальные молекулы при воздействии абиотических стрессовых факторов и во время роста растений. Передача сигналов с участием липидов может происходить через множество рецепторов, включая рецепторы, связанные с G-белком, и ядерные рецепторы. У высших растений, таких как *Arabidopsis thaliana*, омега-3 триеновые жирные кислоты, представленные в основном α-линоленовой кислотой, служат предшественниками жасмоновой

кислоты, которая, являясь мощной сигнальной молекулой, регулирует экспрессию защитных генов в ответ на стрессовые воздействия (Wasternack, 2007). Жирные кислоты участвуют в модуляции накопления эндогенного оксида азота и биосинтеза азелаиновой кислоты, которые влияют на развитие системной приобретенной устойчивости и производство АФК. Окисление и дальнейшее превращение ПННЖК α -диоксигеназой и липоксигеназами производят различные продукты, которые называются оксипипинами (Zhu et al., 2021).

Трансдукция сигналов с участием фосфолипидов включает активацию фосфолипаз и липидкиназ (Ernst, 2016). Цитозольный свободный Ca^{2+} запускает различные липидные сигналы в зависимости от местоположения и чувствительности фосфолипазы к ионам кальция (Wilkins et al., 2016). Фосфатидная кислота участвует в передаче клеточных сигналов и для этой цели образуется двумя способами в основном на плазматической мембране: фосфолипазой D, которая гидролизует связь между фосфатной группой и спиртовой группой (субстрат – глицерофосфолипиды) или за счет последовательного действия фосфолипазы C и диацилглицеринкиназы (субстрат – диацилглицеринпирофосфаты). ФК может запускать каскады протеинкиназ, а также ингибировать протеинфосфатазы, напрямую влияя на ферментативную активность и / или привязывая сигнальные ферменты к определенным мембранам или участкам мембраны (Wang, 2005). Например, высокие концентрации Na^+ вызывали увеличение ферментативной активности фосфолипазы D α 1, что приводило к быстрому накоплению фосфатидной кислоты в качестве вторичного посредника липидов. ФК связывается с митоген-активируемой протеинкиназой и приводит к ее активации, которая фосфорилирует Na^+/H^+ -антипортёр, способствуя снижению накопления Na^+ в листьях *Arabidopsis thaliana* (Yu et al., 2010). Таким образом, ФК может активировать белки, направляя их в определенное место для выполнения нужной функции.

Фосфатидилинозиты могут фосфорилироваться в полифосфатидилинозиты (ПФИ). Метаболизм ПФИ регулируется специфическими киназами, фосфатазами и фосфолипазами. В свою очередь, ПФИ выполняют двойную функцию, либо становятся главной сигнальной молекулой, либо предшественником для других молекулярных мессенджеров. Например, исследование Bak et al. (2013) показало, что фосфатидилинозит-3,5-дифосфат важен для динамики вакуолей и закрытия устьиц. Авторы предположили, что фосфатидилинозит-3,5-дифосфат может активировать протонные насосы, локализованные в вакуольной мембране, и тем самым подкислять содержимое вакуоли. Подкисленная вакуоль претерпевает структурные изменения, высвобождая осмолиты, и обеспечивает быстрое закрытие устьиц. Быстрое закрытие устьиц необходимо для сохранения воды у растений и, следовательно, критически важно для выживания растений в условиях водного дефицита. Интересные результаты были получены при определении роли фосфатаз (SAC2-SAC5) и фосфатидилинозит-3-фосфатов в процессах вакуолярного транспорта и морфогенеза (Novakova et al., 2014). Установлено, что фосфатаза (SAC2-SAC5) локализована в тонопласте *Arabidopsis thaliana* и участвует в превращении фосфатидилинозит-3,5-дифосфат в фосфатидилинозит-3-фосфат, тем самым влияя на морфологию вакуолей. Мутантные линии *Arabidopsis thaliana* с повышенным синтезом SAC-фосфатаз приводили к накоплению фосфатидилинозит-3-фосфатов и образованию запасующих вакуолей, и наоборот, мутантные линии с подавленным синтезом SAC-фосфатаз – к накоплению фосфатидилинозит-3,5-дифосфат и образованию литических вакуолей. Показано, что при солевом стрессовом воздействии на клетки *Arabidopsis thaliana* резко повышалось количество фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (в 8-25 раз) (Pical et al., 1999).

Установлено, что мембранные стерины тоже влияют на передачу сигналов благодаря своей ключевой роли в организации липидных рафтов (Simons and Ikonen, 1997). Согласно (Carland et al., 2002), стерины, находящийся

в липидных рафтах, связываются с рецептором и инициируют сигнальный каскад.

Кампестерин является предшественником в синтезе стероидных гормонов растений – брассиностероидов, которые, в свою очередь, влияют на мембранный потенциал и состав жирных кислот (Валитова и др., 2016; Bajguz et al., 2020).

1.6. Выводы из обзора литературы

Анализ литературных данных показал, что на сегодняшний день биофизические свойства отдельных классов липидов подробно изучались на искусственных мембранах. В биологических мембранах ремоделирование липидов происходит в ответ на различные абиотические и биотические стрессы и способствует поддержанию свойств мембран, влияя на динамику липидов, целостность мембран и функции белков в мембране. Однако липиды выполняют не только структурные функции. Определенные классы липидов участвуют в сигналинге при стрессовых воздействиях, при этом липиды не только инициируют защитные реакции, но и могут быть сигнальными молекулами.

В отличие от других организмов, растительные клетки имеют уникальную органеллу – вакуоль. Вакуолярная мембрана или тонопласт отделяет цитоплазму от внутреннего пространства вакуоли. Вакуолярная мембрана обеспечивает транспорт веществ, участвует в поддержании тургора клетки и в процессах аутофагии. В настоящее время изменения липидного состава тонопласта при стрессовых условиях изучались только при высоких и низких температурах. Поэтому цель нашей работы состояла в исследовании липидного состава тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* при окислительном и осмотических стрессах для выяснения возможной роли липидов в защитных механизмах растительной клетки.

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) сорт Модана. Корнеплоды хранили в овощехранилище в течение нескольких месяцев при +4 – +5 °С.

Корнеплоды *Beta vulgaris* были выбраны в качестве объекта нашего исследования по следующим причинам:

1) корнеплод *Beta vulgaris* – типичный запасающий орган, в вакуолях которых происходят интенсивные транспортные процессы, именно в них накапливаются в больших количествах сахара, органические кислоты, ионы солей, токсичные тяжелые металлы, продукты метаболизма гормонов, аминокислоты;

2) для выделения вакуолей из корнеплодов *Beta vulgaris* разработаны препаративные методы выделения, снимающие ряд технических ограничений при выборе методов исследования активности ферментов;

3) растительный материал хорошо хранится, что дает возможность проводить опыты в течение всего года.

2.2. Условия создания стрессового воздействия

В данной работе мы исследовали окислительный стресс и два вида осмотического стресса: гиперосмотический и гипоосмотический.

Гипоосмотический стресс создавали путем помещения очищенных корнеплодов в дистиллированную воду на 24 ч.

Гиперосмотический стресс создавали следующим образом: неочищенные корнеплоды *Beta vulgaris* в течение трех суток увядали при комнатной температуре.

Окислительный стресс – кусочки ткани корнеплода размером 1 см³ инкубировали в растворе 100 мМ H₂O₂ в течение 16 ч.

В ходе работы использовались различные контроли для установления влияния осмотического и окислительного стрессов, потому как осмотическому

стрессовому воздействию подвергались целые корнеплоды, а окислительному – кусочки ткани корнеплодов. Для осмотических стрессов контролем служили целые корнеплоды без осмотических воздействий, для окислительного стресса – кусочки ткани корнеплодов размером 1 см³ инкубировали в дистиллированной воде. Для характеристики осмотических воздействий измеряли осмотическую концентрацию клеточного сока на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Россия) и массу корнеплодов до и после осмотического стресса.

2.3. Методы для характеристики стрессовых воздействий

2.3.1. Кондуктометрический метод

Для определения выхода электролитов из тканей корнеплода использовали кондуктометрический метод (Грищенко, Лукаткин, 2005). Кусочки ткани корнеплодов инкубировали 16 ч. в дистиллированной воде (контрольный вариант) или в растворе 100 мМ H₂O₂ (опытный вариант). Сразу после окончания стрессового воздействия определяли проницаемость клеточных мембран по выходу электролитов из кусочков ткани в дистиллированную воду с использованием кондуктометра ОК-104 (Radelkis, Венгрия) с платиновым электродом. Затем раствор с растительным материалом доводили до кипения (для разрушения мембран), давали ему остыть до комнатной температуры, после чего объем доводили до исходной величины и по электропроводности определяли полный выход электролитов. Степень выхода электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода.

2.3.2. Метод компьютерной цейтраферной видеосъемки микроскопических образцов

Оценка барьерных свойств мембран осуществлялась с помощью оригинальной экспериментальной установки цейтраферной компьютерной видеосъемки (ЦКВ), позволяющей получать серии компьютерных изображений микроскопических объектов (Нурминский и др., 2004). Результаты видеосъемки использовались для изучения динамики разрушения мембран вакуолей. Изолированные вакуоли получали микрообъемным механическим

методом (Саляев и др., 1981). Для этого корнеплод *Beta vulgaris* нарезали на брусочки шириной ~5 мм и длиной 2-3 см. 3-4 брусочка помещали на 2 мин в чашку Петри с раствором выделения (800 мМ KCl, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ NaH₂PO₄/KOH, pH 8,0). Затем брусочки *Beta vulgaris* нарезали лезвием безопасной бритвы на тонкие пластинки (толщиной ~1 мм). Кусочки ткани оставляли в растворе еще на 2 минуты, после чего вынимали из чашки Петри пинцетом. Вакуоли, осевшие на дно, определяли в бинокляр как красные шарики на розовом фоне. Вакуоли засасывали в микропипетку и переносили в камеры установки для цейтраферной компьютерной видеосъемки с раствором выделения. Компьютерная обработка данных ЦКВ осуществлялась с помощью программы CellsPro, функционирующей в среде Matlab.

2.3.3. Определение содержания диеновых конъюгатов

Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов (ДК), проводили по методике (Владимиров, Арчаков, 1972). После взвешивания и замораживания жидким азотом 1 г корнеплода *Beta vulgaris* растирали с 2 мл смеси (1:1) гексан-изопропанол. Объем доводили до 9 мл. Инкубировали 15 мин, затем добавляли 1 мл дистиллированной воды для разделения фаз, еще раз перемешивали и оставляли на 30 мин для расслаивания. Затем осторожно отбирали сверху 0,5 мл гексановой фракции, помещали в кювету, добавляли 2,5 мл этанола. Измерение проводили на спектрофотометре Specord – S-100 (Analytik Jena AG, Германия) при 203 нм.

Расчетная формула для определения концентрации диеновых конъюгатов:

$C = D \times L / \epsilon$, где D – оптическая плотность при данной длине волны, ϵ – коэффициент молярной экстинкции (для ДК $2,2 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$), L – длина хода луча через раствор (см), C – концентрация вещества (М).

Содержание ДК в растительном материале выражали в нМ/г сухой массы.

2.4. Макрообъемный метод выделения вакуолей

Выделение вакуолей из ткани корнеплодов проводили модифицированным макрообъемный методом, разработанным в лаборатории физиологии растительной клетки СИФИБР СО РАН (Саляев и др., 1981). Детали стандартных операций этого метода заключались в следующем: 600 г запасющей ткани корнеплода *Beta vulgaris* нарезали специальным аппаратом в 800 мл среды изолирования (800 мМ KCl, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 8,0). Раствор с нарезанной массой ткани пропускали через сито с отверстиями 400 мкм для того, чтобы отделить кусочки ткани. Суспензию центрифугировали в 1000-мл стеклянных пробирках 15 мин при 250 g на центрифуге К-70 (Janetzki, ГДР). Затем осадок вакуолей ресуспендировали в 20 мл раствора, содержащего 1 М KCl, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl_2 , 5 мМ трис – HCl, pH 7,4. Полученную суспензию, обогащенную вакуолями, с небольшой примесью клеточных стенок, ядер и следовых количеств митохондрий, объединяли по 80 мл и центрифугировали в 100 мл стеклянных пробирках 10 мин при 50 g на препаративной центрифуге К-23 (Janetzki, ГДР). В результате осаждались крупные вакуоли с незначительными включениями клеточных стенок.

2.5. Метод выделения тонопласта

Для получения вакуолярных мембран осадок вакуолей подвергали осмотическому шоку в гипотоническом растворе (1мМ MgCl_2 , 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ трис-HCl, pH 7,4). Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 5000 g на препаративной центрифуге KR-22 (JOUAN, Франция). Надосадочную жидкость, содержащую везикулы тонопласта в разбавленном гипотонической средой вакуолярном соке, центрифугировали 90 минут при 105 000 g на препаративной центрифуге Sorvall Discovery 90SE (Япония). Надосадок удаляли, осадок извлекали из пробирок и хранили во фризере при – 80 °С до начала проведения опытов.

2.6. Экстракция липидов

Общие липиды из тонопласта экстрагировали модифицированным методом Фолча (Folch et al., 1957). Для экстракции липидов из вакуолей и вакуолярных мембран использовали систему хлороформ – метанол – вода (2:1:0,8 по объему). К выделенному тонопласту добавляли 5 мл системы хлороформ – метанол – вода. Полученную смесь гомогенизировали в течение 30 мин. Отбирали нижнюю фракцию в чистый бюкс. Снова добавляли 5 мл смеси к тонопласту. Всего повторяли процедуру три раза. Хлороформный и водно-метанольный слои разделяли в делительной воронке. Водорастворимые нелипидные примеси переходят в водно-метанольный раствор, а в хлороформном слое содержатся липиды. Хлороформ из липидного экстракта удаляли под вакуумом с помощью роторного испарителя RV 8 V-C (IKA, Германия) или в токе аргона, а затем взвешивали на аналитических весах GH-202 (AND, Япония) с точностью до 0,000001 г (гравиметрический метод).

2.7. Анализ жирнокислотного состава липидов

Метилловые эфиры жирных кислот (ЖК) получали по методу (Christie, 1993). К экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1% метанольный раствор H_2SO_4 и нагревали на водяной бане при 60 °С в течение 30 мин. После охлаждения трижды экстрагировали метилловые эфиры ЖК гексаном (3×5). Анализ метиловых эфиров ЖК тонопласта проводили с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent technology 5973N/6890N MSD/DS (США). Детектор – масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0,50 мкм). Неподвижная фаза – полиэтиленгликоль. Подвижная фаза – гелий; скорость потока газа – 1 мл/мин. Температура испарителя 250 °С, источника ионов 230 °С, детектора 150 °С, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром – 280 °С. Диапазон сканирования 41-450 а.е.м. Объем вводимой

пробы – 1 мкл, разделение потоков 5:1. Хроматографирование проводили в изотермическом режиме при 200 °С. Для идентификации пиков метиловых эфиров жирных кислот использовали стандарты метиловых эфиров (Sigma, США) и данные библиотеки масс-спектров NIST 05 (Dobson, 1993; Wolff and Christie, 2002).

Для оценки степени ненасыщенности жирных кислот рассчитывали индекс двойной связи (ИДС) по формуле (Lyons et al., 1964):

$$\text{ИДС} = \sum P_j \times n/100$$
, где P_j – содержание жирных кислот (вес, %); n – количество двойных связей в каждой кислоте.

Рассчитывали сумму ненасыщенных жирных кислот ($\sum_{\text{ннжк}}$), сумму насыщенных жирных кислот ($\sum_{\text{нжк}}$) и отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот ($\sum_{\text{ннжк}}/\sum_{\text{нжк}}$).

2.8. Качественный и количественный анализ фосфолипидов

Для обнаружения и идентификации фосфолипидов в растительном материале использовали специфические реагенты: для фосфорсодержащих компонентов молибденовый синий (Vaskovsky and Latyshev, 1975), для аминокислотсодержащих липидов – 0,2%-ый раствор нингидрина в ацетоне (Кейтс, 1975), также применяли антроновый реагент (обрабатывали пластинку 10% серной кислотой в воде, затем сразу же опрыскивали 0,5% антроном в бензоле, нагревали в сушильном шкафу при температуре 110 °С; голубая и синяя окраска пятен соответствовала гликолипидам, коричневая – ФЛ, светло-голубая – цереброзидам).

Фосфолипиды тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* количественно определяли аналитической тонкослойной хроматографией по неорганическому фосфору методом Васьковского (Vaskovsky and Latyshev, 1975). Для этого, мерным шприцом на стеклянную пластинку с силикагелем (фирмы Macherey-Nagel) наносили экстракт липидов тонопласта *Beta vulgaris*. Для разделения липидов использовали двумерную систему: первое направление – хлороформ – метанол – бензол – 28% NH_4OH (65:30:10:6), второе направление – хлороформ

– метанол – уксусная кислота – ацетон – бензол – вода (70:30:4:5:10:1). После разделения смеси липидов ФЛ обнаруживали с помощью 10% серной кислоты в этаноле. Силикагель из зон, содержащих разделенные ФЛ, переносили микрошпателем в жаростойкие пробирки, добавляли в каждую 0,05 мл 72% хлорной кислоты. Контролем служили образцы с добавлением силикагеля, взятого с чистого участка нижней части хроматограммы, площадью, равной средней величине пятна. Сжигание проводили на песчаной бане при 180-200 °С в течение 20 мин, помещая пробирки так чтобы верхняя часть служила воздушным холодильником для паров хлорной кислоты. После охлаждения в пробирки вносили по 0,45 мл рабочего реагента, для которого к 5,5 мл исходного молибдатного реагента добавляли 26 мл 1N серной кислоты и доводили объем до 100 мл дистиллированной водой (реагент использовали в течение недели). Исходный молибдатный реагент в свою очередь готовили следующим образом: 10 г молибдата натрия добавляли к 60 мл 4N HCl, 0,4 г гидрозина солянокислого добавляли к 14 мл 4N HCl, два реактива соединяли и нагревали 20 мин на кипящей водяной бане. Раствор охлаждали и добавляли 14 мл концентрированной серной кислоты, доводили объем до 100 мл дистиллированной водой (реактив хранился в посуде из темного стекла при комнатной температуре несколько месяцев). Смесь в пробирке тщательно перемешивали с помощью шейкера Works Minishaker Vortex Mixer MS1 S1 (ИКА, Германия). Пробирки помещали на кипящую водяную баню на 15 мин, охлаждали, силикагель удаляли центрифугированием (10 мин при 700 g) и измеряли величину оптической плотности при 815 нм на спектрофотометре Specord – S-100 (Analytik Jena AG, Германия). Количество фосфора в ФЛ определяли по калибровочному графику, используя для его построения аликвотные части стандартного раствора фосфата (Na_2HPO_4), содержащего от 0,1 до 0,5 мкг фосфора. Для перерасчета использовали коэффициенты, которые представляют собой отношение молекулярной массы каждого фосфолипида к атомной массе фосфора. При расчете содержания липидов были приняты

следующие молекулярные массы фосфолипидов: ФЭ – 744,1, ФХ – 748,1, ФИ – 856,6, ФС – 792,0, ФК – 686,2 (Novitskaya et al., 2006).

2.9. Качественный и количественный анализ гликоглицеролипидов

Для обнаружения и идентификации гликолипидов в растительном материале использовали антроновый реагент и стандарты МГДГ и ДГДГ.

Гликоглицеролипиды тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* количественно определяли аналитической тонкослойной хроматографией по галактозе методом (Dubois et al., 1956) в модификации (Roughan and Batt, 1968). Для этого мерным шприцом на стеклянную пластинку с силикагелем (фирмы Macherey-Nagel) наносили экстракт липидов тонопласта *Beta vulgaris*. Для разделения липидов использовали одномерную систему ацетон – бензол – вода (91:30:8). После разделения смеси липидов ГЛ обнаруживали в парах йода. Зоны с гликоглицеролипидами счищали с силикагелем в центрифужные пробирки. Контролем служили образцы с добавлением силикагеля, взятого с чистого участка нижней части хроматограммы, площадью, равной средней величине пятна. К силикагелю с липидами добавляли 1 мл 2% фенольного раствора, быстро приливали 4 мл концентрированной серной кислоты и интенсивно перемешивали на шейкере Works Minishaker Vortex Mixer MS1 S1 (ИКА, Германия). Через 15 мин силикагель осаждали центрифугированием (5 мин 2000 об/мин). Измеряли величину оптической плотности при 480 нм на спектрофотометре Specord – S-100 (Analytik Jena AG, Германия). Количество галактозы в гликоглицеролипидах определяли по калибровочной кривой, используя для ее построения аликвотные части стандартного раствора галактозы, содержащего от 2 до 50 мкг галактозы. Для перерасчета использовали коэффициенты, которые представляют собой отношение молекулярной массы каждого гликоглицеролипида к атомной массе галактозы. При расчете содержания липидов были приняты следующие молекулярные массы гликоглицеролипидов: МГДГ – 774,4, ДГДГ – 936,5 (Novitskaya et al., 2006).

2.10. Количественный анализ стерина

Суммарные стерин тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* силилировали, нагревая образец в течение 30 мин при 70 °С с добавлением 150 мкл N,O-бис(триметилсилил)ацетамида, 50 мкл гексаметилдисилазана (Sigma-Aldrich, США) и 300 мкл этилацетата. В качестве внутреннего стандарта использовали эргостерин (Дударева, 2020). Образовавшиеся триметилсилильные производные стерина были проанализированы с помощью хромато-масс-спектрометра GC–MS 7000/7890A TripleQuad, Agilent Technologies (США). Объем вводимой пробы – 0,02 мкл. Температура испарителя 250 °С, источника ионов – 230 °С, детектора – 150 °С, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, – 280 °С. Диапазон сканирования 41–550 а.е.м. Для разделения компонентов использовали капиллярную колонку HP-5MS (30 м×0,250 мм×0,50 мкм), Agilent Technologies (США). Неподвижная фаза – 5% фенилметилполисилоксан. Градиент температуры: 2 мин при 150 °С, затем со скоростью 10 °С/мин температуру повышали до 300 °С и выдерживали в течение 15 мин. Подвижная фаза – гелий, скорость потока газа – 1 мл/мин. Разделение потоков 5:1. Масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI) (энергия ионизации: 70 эВ). Идентификацию стерина проводили путем сравнения их времен удержания со стандартами, а также использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количественный анализ был проведен с использованием калибровочной кривой по холестерину, кампестерину, стигмастерину и β-ситостерину с учетом отклика внутреннего стандарта.

2.11. Используемые реактивы

В работе использовали следующие реактивы фирмы Sigma (США): ЭДТА, β-ситостерин, холестерин, стигмастерин, кампестерин, эргостерин, гексаметилдисилазан, нингидрин, антрон, N,O-Бис(триметилсилил)ацетамид, моногалактозилдиацилглицерины, дигалактозилдиацилглицерины. Остальные реактивы были отечественного производства: перекись водорода, хлорид калия,

дигидрофосфат натрия, гидроксид калия, гексан, хлорид магния, трихлорметан (хлороформ), гексан, изопропанол, трис, соляная кислота, метанол, серная кислота, ацетон, бензол, уксусная кислота, гидроксид аммония, хлорная кислота, молибдат натрия, гидрозин солянокислый, фенол.

2.12. Статистическая обработка данных

Эксперименты проводили не менее чем в пяти независимых повторностях ($n=5$). Полученные данные представляли в виде средней арифметической (M) или медианы (Me), а разброс значений – в виде стандартного отклонения ($\pm S.D.$) или интерквартильной широты [25%; 75% процентиль]. С помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk) проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479-2002). Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$ (Гланц, 1999).

При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ и последующее множественное сравнение средних проводили по методу Тьюки для осмотических стрессовых воздействий, так как сравнение было против одного контроля. Для доказательства наличия значимых различий между средними при окислительном стрессовом воздействии использовали парный двухвыборочный t -тест.

Если распределение отличалось от нормального, для доказательства наличия значимых различий между медианами использовали H -критерий Краскела-Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса или Данна для осмотических стрессовых воздействий. Для доказательства наличия значимых различий между медианами при окислительном стрессовом воздействии использовали тест Манна-Уитни.

Статистические расчеты осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка влияния стрессовых воздействий

При осмотических стрессах происходили существенные изменения массы корнеплода *Beta vulgaris* и осмотической концентрации клеточного сока. При гиперосмотическом стрессе масса корнеплода снижалась на 20%, осмотическая концентрация клеточного сока увеличивалась на 13%, а при гипоосмотическом стрессе, наоборот, масса увеличивалась на 20%, а осмотическая концентрация снижалась на 12% (Ozolina et al., 2016).

О процессах перекисного окисления липидов можно судить по увеличению содержания диеновых конъюгатов в тканях корнеплодов (рис. 12).

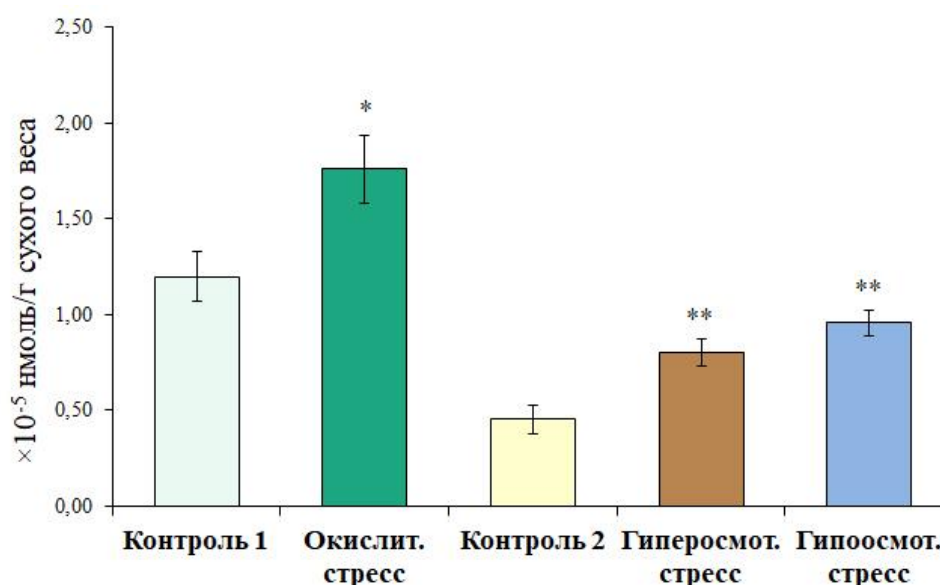


Рис. 12. Содержание диеновых конъюгатов при окислительном и осмотических стрессах в тканях корнеплодов *Beta vulgaris*

Примечание: $n=5$, $M \pm S.D.$ * – наличие значимых различий в сравнении с контролем 1, значимость различий рассчитана с помощью t-теста, ** – наличие значимых различий в сравнении с контролем 2, значимость различий рассчитана с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Последующее множественное сравнение средних проводили по методу Тьюки. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид (МДА) возникают в результате перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот липидов. Они являются наиболее информативными показателями наличия

окислительного стресса. При окислительном стрессе выход диеновых конъюгатов увеличивался на 47%. В условиях осмотических стрессов количество диеновых конъюгатов было почти в два раза больше, чем в контроле. При воздействии свинца на *Trigonella foenum graecum* содержание диеновых конъюгатов в листьях возрастало в три раза (Xalxo and Keshavkant, 2018). Количество МДА увеличивалось и при недостатке воды в проростках *Brassica rapa* (на 82%), а также при избыточном увлажнении корней *Deschampsia antarctica* (на 84%) (Bhuiyan et al., 2019; Park and Lee, 2019).

Состояние проницаемости мембран оценивали по выходу электролитов из тканей корнеплода в условиях стрессового воздействия (рис. 13).

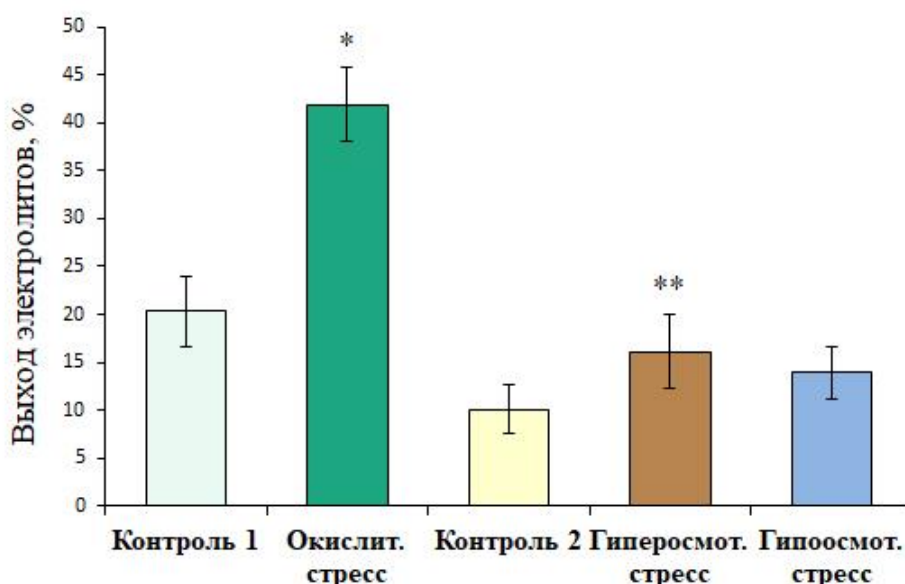


Рис. 13. Характеристика окислительного и осмотических стрессов кондуктометрическим методом по выходу электролитов из тканей корнеплодов *Beta vulgaris*

Примечание: $n=5$, $M \pm S.D.$ * – наличие значимых различий в сравнении с контролем 1, значимость различий рассчитана с помощью t-теста, ** – наличие значимых различий в сравнении с контролем 2, значимость различий рассчитана с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Последующее множественное сравнение средних проводили по методу Тьюки. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В ответ на гиперосмотический стресс выход электролитов возрастал на 59%, а при окислительном стрессе на 106%. Показано, что при солевом стрессовом воздействии выход электролитов из тканей листьев оливковых

деревьев возрастал, а также после воздействия 10,0 мкМ мышьяка на семена *Phaseolus aureus* утечка электролитов из тканей проростков увеличивалась на 88,7% (Singh et al., 2007; Zahedi et al., 2021).

При оценке стабильности изолированных вакуолей методом цейтраферной видеосъемки было установлено, что стабильность мембран изменялась при всех изучаемых стрессах (рис. 14). Самые интенсивные разрушения вакуолей было отмечены в условиях гипоосмотического стресса (разрушение в 4,5 раза больше, чем в контроле). При гиперосмотическом стрессе период полураспада уменьшался на 28%, при окислительном практически в два раза, на 54%.

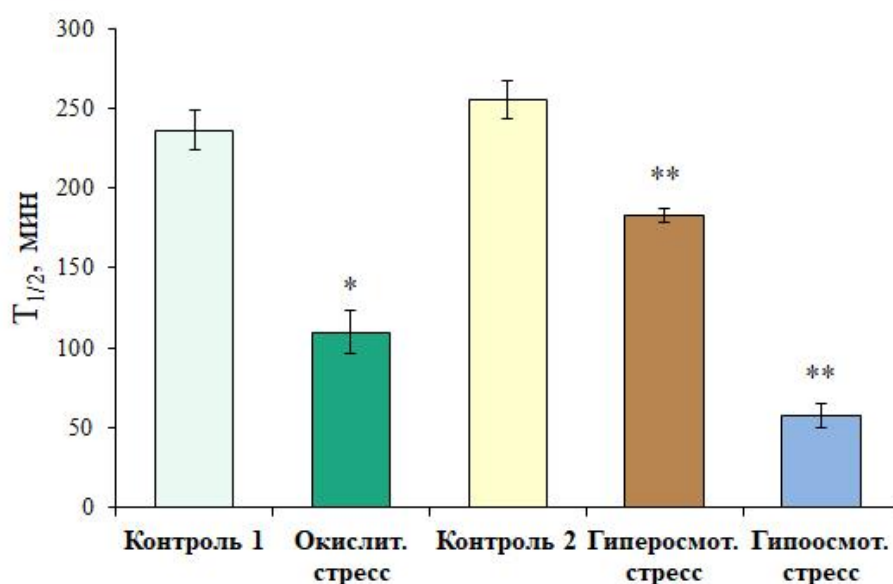


Рис. 14. Влияние окислительного и осмотических стрессов на период полураспада изолированных вакуолей корнеплодов *Beta vulgaris*

Примечание: $n=5$, $M \pm S.D.$ * – значимость различий в сравнении с контролем 1, рассчитана с помощью t-теста, ** – значимость различий в сравнении с контролем 2, рассчитаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Последующее множественное сравнение средних проводили по методу Тьюки. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Таким образом, данные оценки стрессового воздействия на ткани корнеплода показывают, что стрессовая нагрузка в условиях окислительного и осмотических воздействий на клетки *Beta vulgaris* была достаточно интенсивной.

3.2. Влияние окислительного стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта

Суммарное содержание липидов тонопласта уменьшалось почти в два раза после окислительного стрессового воздействия (рис. 15). Значительное снижение общих липидов в корнях, побегах и листьях *Trigonella foenum graecum* отмечалось в ответ на стресс от свинца, а также при имитации воздействия кислотного дождя (Xalxo and Keshavkant, 2018).

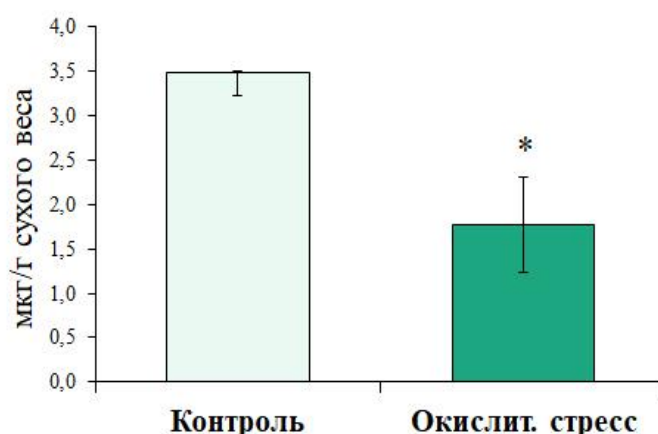


Рис. 15. Содержание суммарных липидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Изменения, которые произошли в жирнокислотном составе липидов вакуолярной мембраны при окислительном воздействии, представлены в таблице 4. Среди НЖК тонопласта в контрольном варианте и после окислительного воздействия преобладали пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты, а среди ННЖК – олеиновая (C18:1(n-9)) и линолевая (C18:2(n-6)).

Таблица 4

Влияние окислительного стресса на жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris*, (% от суммы ЖК)

Жирные кислоты	Контроль	Окислит. стресс
C12:0 , лауриновая	0,25 [0,24; 0,26]	0,52 [0,45; 0,59] *
C14:0 , миристиновая	0,92 [0,83; 0,98]	0,97 [0,92; 1,02]
C15:0 , пентадекановая	1,00 [0,96; 1,05]	1,31 [1,3; 1,36] *
C16:0 , пальмитиновая	31,04 [30,53; 31,69]	34,89 [34,36; 35,61] *
C16:1 , пальмитолеиновая	0,74 [0,74; 0,76]	1,25 [1,22; 1,35] *
C18:0 , стеариновая	5,45 [4,95; 5,71]	3,9 [3,67; 4,1] *
C18:1(n-9) , олеиновая	23,93 [23,25; 24,61]	22,18 [21,96; 22,64]
C18:1(n-7) , цис-вакценовая	1 [0,96; 1,03]	1,05 [1,02; 1,07]
C18:2(n-6) , линолевая	33,04 [32,72; 33,26]	30,6 [29,88; 31,51] *
C18:3(n-3) , линоленовая	1,88 [1,68; 2,12]	2,2 [1,98; 2,44]
C20:0 , арахидовая	0,41 [0,32; 0,51]	-
C22:0 , бегеновая	0,5 [0,48; 0,54]	0,43 [0,39; 0,47]
ИДС	0,97 [0,96; 0,98]	0,93 [0,92; 0,94]
ΣНЖК	39,78 [38,81; 40,45]	42,03 [41,77; 42,48]
ΣННЖК	60,22 [59,55; 61,19]	57,97 [57,52; 58,23]
ΣННЖК/ΣНЖК	1,51 [1,47; 1,58]	1,38 [1,35; 1,39] *

Примечание: n=5, Me [25%; 75%]. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,01$.

При рассмотрении изменений минорных ЖК, можно отметить, что содержание лауриновой ЖК (C12:0) после стрессового воздействия увеличилось почти в два раза. Значительное повышение этой ЖК было отмечено в клеточных мембранах *Zygosaccharomyces rouxii*, при культивировании клеток на среде с добавлением NaCl (Wang et al., 2020). При

воздействии ультрафиолетового излучения количество лауриновой ЖК во флоэме *Brassica napus* увеличивалось в одиннадцать раз (Madey et al., 2002).

После окислительного стресса возрастало также количество пентадекановой кислоты (C15:0) (на 31%). Жирные кислоты с нечетной цепью редко встречаются в биологических системах и образуются при α -окислении C_n жирных кислот (Hamberg et al., 1999). Известно, что α -диоксигеназа, катализирует первую стадию α -окисления и способствует образованию пентадекановой ЖК из пальмитиновой ЖК (Sanz et al., 1998).

Количество пальмитиновой ЖК (C16:0) увеличилось на 12% от контроля после окислительного воздействия. Пальмитиновая ЖК в основном преобладает в составе высокополярных липидов, которые могут быть приравнены к аннулярным липидам (они более упорядочены, менее подвижны, имеют в составе более насыщенные жирные кислоты и выделяются из мембраны вместе с белком). Без них невозможно функционирование многих ферментных систем. Содержание пальмитиновой ЖК значительно возрастало при холодовом стрессе в мембранных липидах митохондрий проростков *Triticum aestivum* (Верещагин и др., 1985). Мембраны более солеустойчивых растений включают в состав входящих в них ФЛ гораздо больше НЖК, и, в частности, пальмитиновую ЖК, что является, по-видимому, защитной реакцией на солевой стресс (Жуков, 2015). При влиянии низкоинтенсивного лазерного излучения, сходного с воздействием любого другого абиотического стрессора, на каллусные ткани *Triticum aestivum* было отмечено увеличение доли пальмитиновой ЖК (Дударева и др., 2014). В ответ на высокую температуру (34°C) происходило небольшое увеличение пальмитиновой ЖК и в вакуолярных мембранах *Kalanchoë daigremontiana* (на 11%) (Behzadipour et al., 1998), а также в тонопласте *Ananas comosus* и *Kalanchoë pinnata* (на 11% и 8%, соответственно) (Lin et al., 2008).

При окислительном стрессовом воздействии содержание стеариновой кислоты (C18:0) снизилось. Уменьшение (в 2 раза) количества стеариновой ЖК

было отмечено у корней и coleoptилей этиолированных проростков *Triticum aestivum* и *Zea mays*, выращенных при низкой температуре (4 °C) (Макаренко и др., 2010). Снижение стеариновой ЖК было зарегистрировано при влиянии низкоинтенсивного лазерного излучения на каллусные ткани *Triticum aestivum* (Дударева и др., 2014). Значительное уменьшение содержания стеариновой ЖК также отмечено и в тонопласте *Kalanchoë pinnata* при воздействии высокой температуры (в 2 раза) (Lin et al., 2008).

Среди ННЖК количественные изменения происходили в основном с пальмитолеиновой ЖК (C16:1) – содержание увеличивалось на 30% и линолевой ЖК (C18:2(n-6)) – содержание снижалось на 7,4%. При засолении количество пальмитолеиновой ЖК в листьях *Artemisia annua* существенно увеличивалось (на 186%) (Qureshi et al., 2013). Экспрессия дрожжевой (*Saccharomyces cerevisiae*) Δ -9-десатуразы жирных кислот в *Nicotiana tabacum* увеличивала количество пальмитолеиновой ЖК (Polashock et al., 1992). Липидный анализ показал, что избыточное продуцирование пальмитолеиновой ЖК включается в большинство основных классов полярных липидов, включая цитоплазматическую «эукариотическую» фракцию хлоропластных гликоглицеролипидов. Однако в вакуолярных мембранах *Ananas comosus* и *Kalanchoë pinnata* при высокотемпературном стрессе количество пальмитолеиновой ЖК резко снижалось (в 7 и 11 раз) (Lin et al., 2008). Подавление экспрессии генов пататин-подобных белков у растений *Gossypium hirsutum* последовательно снижало накопление линолевой ЖК (18:2) и α -линоленовой ЖК (18:3), подавляло биосинтез жасмонатов и защитные реакции, опосредованные жасмонатом (Zhu et al., 2021). В вакуолярных мембранах *Kalanchoë daigremontiana* и при высоких, и при низких температурах происходило снижение линолевой ЖК (в 1,5 раза) (Behzadipour et al., 1998). Другая картина наблюдалась в тонопласте *Kalanchoë pinnata* – количество линолевой ЖК возрастало на 65,7% при влиянии высоких ночных температур (Lin et al., 2008).

В наших экспериментах, при стрессовом воздействии на вакуолярную мембрану, суммарные количества НЖК и ННЖК статистически значимо не изменялись. Увеличение НЖК мембранных липидов влияет на такой показатель, как микровязкость, и делает мембрану менее эластичной. Так, например, этот процесс при засолении вызывает адаптационный эффект снижения проницаемости мембран для ионов натрия (Wu et al., 1998). Известно, что НЖК менее чувствительны к окислительному повреждению, и защита от этого повреждения животных тканей связана с повышением насыщенности ЖК липидов (Portero-Otin et al., 2001).

При изучении фосфолипидов, основного класса мембранных липидов, было установлено, что преобладающими липидами в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* были фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины (рис. 16).

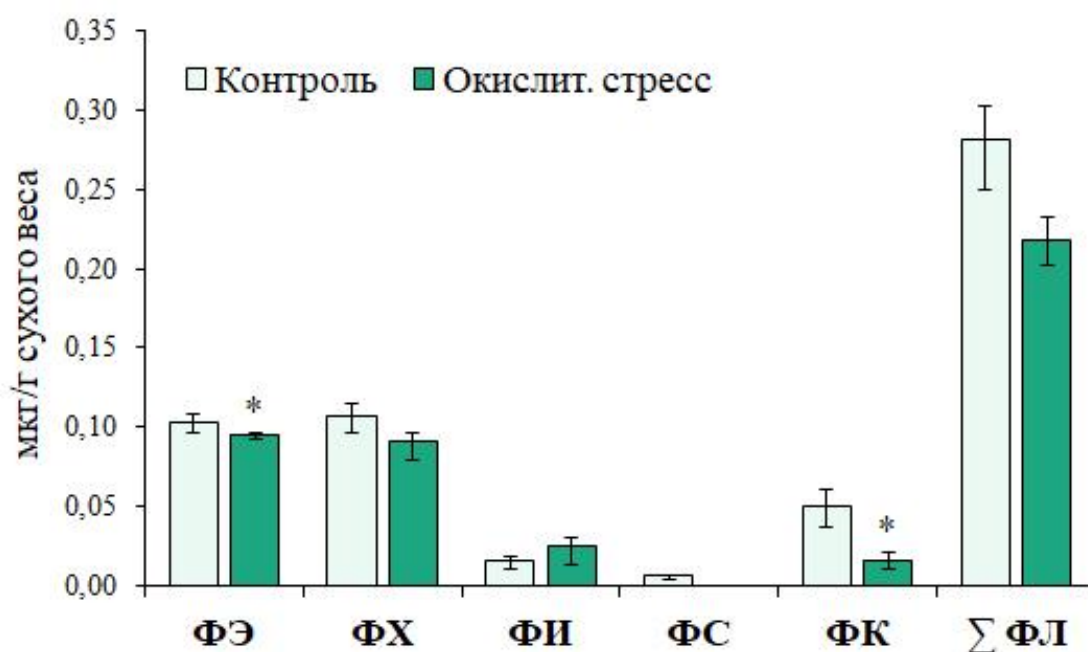


Рис. 16. Содержание фосфолипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

После окислительного воздействия количество ФЭ и ФК снижалось. Вероятно, снижение содержания этих липидов связано со стабилизацией

мембранного бислоя, так как они имеют малую головную группу и по строению похожи на усеченный конус, вызывая деформацию отрицательной кривизны. Согласно имеющимся данным, этот переход влияет на такие характеристики мембраны, как проницаемость и микровязкость. В листьях *Triticum aestivum* при тепловом стрессе содержание ФЭ тоже снижалось, но при проведении опытов на изолированных мембранах, результаты были противоположными (Narayanan et al., 2016). Так, отмечено увеличение содержания ФЭ среди липидов плазматической мембраны из корней *Avena sativa*, акклиматизированных к дефициту воды (Norberg and Lijenberg, 1991). Существенное повысилось количество ФЭ при высокотемпературном стрессовом воздействии во фракции мембранных липидов *Poa pratensis*, устойчивых к этому температурному воздействию. Содержание ФЭ не изменялось в растениях, которые не имели устойчивости к жаре. Поэтому авторы этих исследований предложили использовать динамику изменения содержания ФЭ как потенциальный биомаркер на устойчивость к тепловому стрессу (Su et al., 2009).

Количественные изменения ФК при стрессах чаще всего связаны с увеличением ее содержания в связи с участием в клеточном сигналинге. Так, например, содержание ФК возрастало при низких температурах (Arisz et al., 2013) засолении (McLeoughlin et al., 2013), повреждениях, заморозках и других видов стресса (Okazaki and Saito, 2014). После низкотемпературной обработки содержание ФК в листьях *Arabidopsis thaliana* увеличилось в десять раз, но в этих экспериментах содержание ФК в контрольных растениях было всего 0,7% от суммы всех ФЛ в отличие от наших результатов (17,8%) (Welti et al., 2002).

Согласно литературным данным, отношение ФХ к ФЭ оценивает текучесть, целостность мембраны и может изменяться при стрессах (de Vries et al., 2004; Wu et al., 2020). Соотношение ФХ/ФЭ в тонопласте после окислительного стресса уменьшалось на 6,8% (табл. 5). Стоит также отметить отсутствие ФС после окислительного стресса.

Таблица 5

Отношение ФХ/ФЭ среди ФЛ, отношение ДГДГ/МГДГ среди ГЛ и отношение стигмастерин/ β -ситостерин в стеринах вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах

Отношение	Контроль 1	Окислит. стресс	Контроль 2	Гиперосмот. стресс	Гипоосмот. стресс
ФХ/ФЭ	1,03	0,96	1,02	0,65	1,07
ДГДГ/МГДГ	0,25	0,67	0,62	0,46	0,83
Стигмастерин/ β -ситостерин	0,14	0,16	0,1	0,15	0,13

Результаты наших опытов показали, что при окислительном воздействии суммарное содержание гликоглицеролипидов в вакуолярной мембране *Beta vulgaris* увеличилось почти на 75% (рис. 17). Существенное увеличение содержания ГЛ было отмечено и при солевом стрессе среди липидов плазматической мембраны из каллусов галофита *Spartina patens* (Wu et al., 2005) и у мембран хлоропластов из разных тканей *Zea mays* (Omoto et al., 2016).

При окислительном стрессе отмечалось резкое повышение количества ДГДГ (на 246,7% от контрольного варианта). При других стрессовых воздействиях содержание ДГДГ также возрастало. Например, уровень ДГДГ возрастал при стрессе в разных сортах травянистых растений, отличающихся по устойчивости к высокотемпературным воздействиям. Максимальный рост количества ДГДГ наблюдался у растений с более высокой устойчивостью к стрессу (Su et al., 2009). Эти результаты согласуются с выводами других исследователей, которые обнаружили, что при повышении температуры увеличивается содержание ДГДГ (Di Vaccio et al., 2002; Chen et al., 2006). Количество ДГДГ повышалось и в тонопласте *Kalanchoe daigremontiana* при воздействии высоких температур (Behzadipour et al., 1998). Но не только температурный стресс вызывает повышение содержания ДГДГ, но и стресс, вызванный засухой, приводил к увеличению количества ДГДГ. При изучении

динамики липидного состава тилакоидов проростков *Triticum durum* двух сортов (устойчивого и неустойчивого к засухе), содержание ДГДГ увеличивалось на 6% у неустойчивого сорта и на 11% у устойчивого (Quartacci et al., 1995). При разных уровнях обезвоживания клеточных мембран листьев *Arabidopsis thaliana* количество ДГДГ увеличилось с 16,2 до 20,7% (Gigon et al., 2004). Значительное повышение содержания ДГДГ (на 51%) также было показано при изучении динамики изменения липидов *Arabidopsis thaliana* при низкотемпературном стрессе (4 °С) и при закаливании (Welti et al., 2002). Однако в случае солевого стресса в хлоропластных мембранах клеток мезофилла *Zea mays* уровень ДГДГ не отличался от такового в контрольном варианте (Omoto et al., 2016). Согласно исследованиям, посвященным динамике ДГДГ, повышение содержания этого ГЛ связано со стабилизацией липидного бислоя (Narayanan et al., 2015).

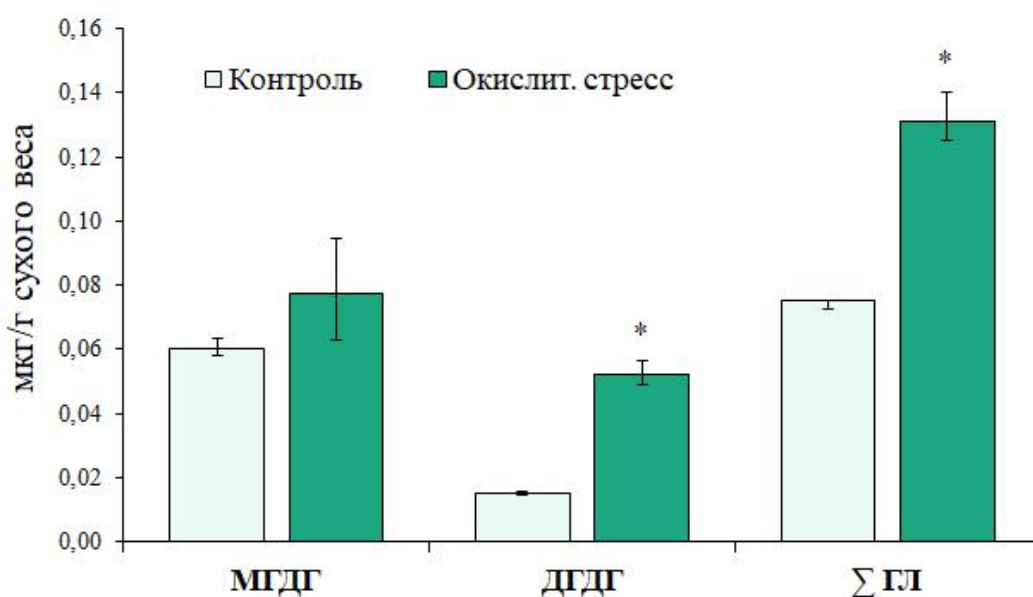


Рис. 17. Содержание гликоглицеролипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Как и отношение ФХ к ФЭ показатель ДГДГ/МГДГ часто используется для оценки стрессового воздействия и адаптационных возможностей мембраны.

При окислительном воздействии ДГДГ/МГДГ в два с половиной раза возрастало (табл. 5). Данный показатель увеличивался и при высокотемпературном стрессе, что, по мнению автора, способствовало увеличению текучести мембран (Pham-Thi et al., 1987). В разных видах травянистых растений, отличающихся по устойчивости к высокотемпературным воздействиям во всех вариантах опыта при переходе от оптимальной температуры к стрессовой соотношение ДГДГ к МГДГ увеличивалось почти в два раза (от 0,59 до 1,11) у устойчивых к стрессу растений. У неустойчивых тоже увеличивалось, но менее существенно (от 0,64 до 0,77). Эти результаты согласуются с результатами других исследователей, которые также показали, что отношение ДГДГ/МГДГ при повышении температуры увеличивалось (Di Baccio et al., 2002; Chen et al., 2006; Wang and Lin, 2006). При изучении влияния комбинированного стресса озон + засуха на мембранные липиды двух сортов *Vigna unguiculata*, у более устойчивого сорта в ответ на стресс также отношение ДГДГ/МГДГ увеличивалось (Reboucas et al., 2017).

Очень интересные результаты были получены при изучении динамики стерина тонопласта при стрессовых воздействиях. На рисунке 18 представлены изменения стерина, которые произошли после окислительного стресса. Количество каждого изучаемого стерина увеличивалось, как и отношение стигмастерина к β -ситостерину (табл. 5). Стерины влияют не только на текучесть и проницаемость мембраны (Mongrand et al., 2004), но и на плотность упаковки других липидов. Так, стерины могут взаимодействовать с насыщенными алкильными цепями ФЛ и сфинголипидов, ограничивая их подвижность (Schuler et al., 1991). Суммарное содержание стерина в наших экспериментах существенно повышалось при окислительном стрессе. Увеличение содержания стерина в мембранах при стрессе (особенно у мембран более стрессоустойчивых сортов растений) по сравнению с неустойчивыми неоднократно было показано разными исследователями (Bohn

et al., 2007; Kumar et al., 2015). Согласно литературным данным, увеличение содержания стерина может приводить к снижению текучести мембраны (Kumar et al., 2015). При окислительном стрессе снижение текучести мембран может быть связано с запуском защитных механизмов и являться важным фактором формирования стрессового ответа. Увеличение в мембране содержания стерина (особенно холестерина) способствует увеличению ее жесткости (Van Blitterswijk et al., 1981), что помогает ограничивать фазовый переход в небислое состояние при высокой температуре (Muramatsu et al., 2000).

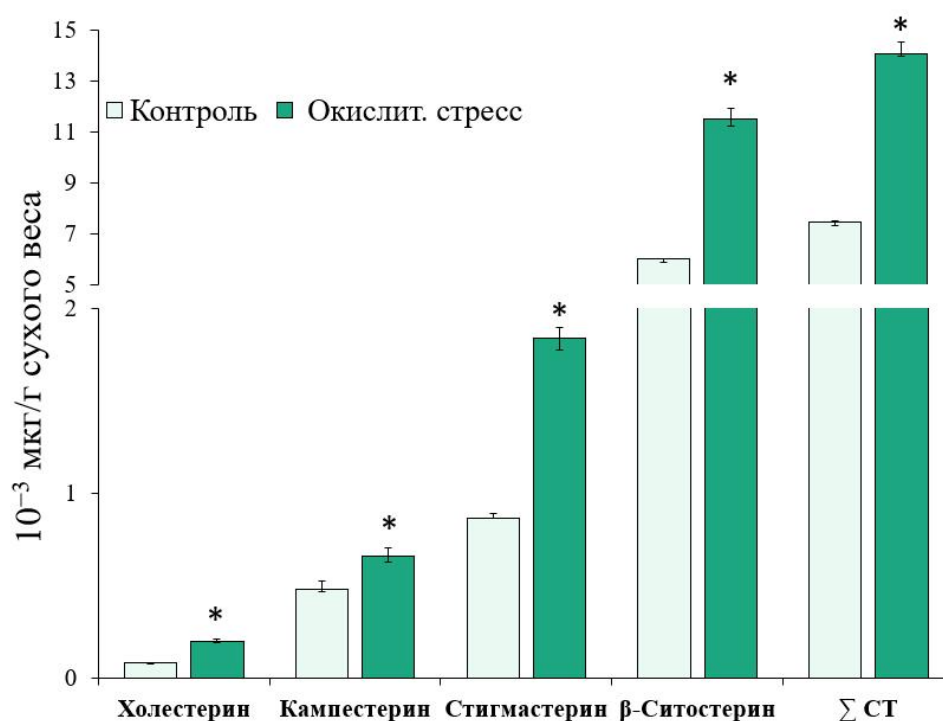


Рис. 18. Содержание стерина в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Интенсивно увеличивалось и содержание β-ситостерина и стигмастерина, на 92% и на 113% соответственно. Известно, что β-ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью (Hidayathulla et al., 2018), а количество

стигмастерина увеличивается при всех стрессовых воздействиях (Валитова и др., 2016). И не случайно при окислительном стрессе мы видим увеличение именно этих стеринов, поскольку они могут принимать участие в защите мембраны от окислительного стресса.

Повышение содержания всех стеринов при окислительном стрессе может также способствовать образованию рафтовых структур, которые были обнаружены и в вакуолярной мембране (Ozolina et al., 2013). Известно, что рафты представляют собой платформы, содержащие рецепторы, участвующие в путях передачи сигналов и регулирующие активность многих мембранных белков, например, аквапоринов, то есть белков, обеспечивающих водную проницаемость мембран (Koffman et al., 2015). Рафтовые структуры, кроме того, представляют собой основу мембранных контактов (Fujimoto et al., 2012). По нашему мнению, мембранные контакты между тонопластом и мембранами поврежденных органелл могут формироваться дополнительно из-за повышенной аутофагии, вызванной окислительным стрессом.

Таким образом, при окислительном стрессовом воздействии общее количество липидов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* снижалось в два раза. Существенные изменения в жирнокислотном составе липидов были отмечены для короткоцепочечных НЖК. Количество лауриновой, пальмитиновой, и пентадекановой ЖК значительно увеличивалось, а содержание стеариновой ЖК уменьшалось. Среди полярных липидов количество ФЭ и ФК снижалось, а содержание ДГДГ увеличивалось в три с половиной раза. Наиболее интенсивные изменения происходили в составе стеринов тонопласта – все классы стеринов резко возрастали.

3.3. Влияние гиперосмотического стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта

Общее количество липидов вакуолярной мембраны уменьшилось на 41,8% от контроля после гиперосмотического стрессового воздействия (рис. 19). При сильной засухе у чувствительного и устойчивого сортов *Vigna*

unguiculata резко снижалось содержание суммарных липидов (De Paula et al., 1990).

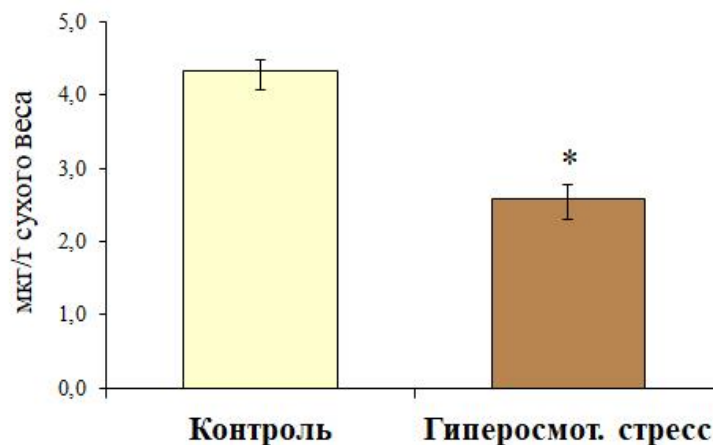


Рис. 19. Содержание суммарных липидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: $n=5$. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Данна. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Данные по содержанию жирных кислот липидов тонопласта обнаруженных после гиперосмотического воздействия приведены в таблице 6. Содержание доминирующих ЖК, таких как линолевая (C18:2(n-6)) и пальмитиновая (C16:0), не изменялось при стрессе.

Интересные изменения произошли с лауриновой ЖК (C12:0), которая полностью отсутствовала в тонопласте нестрессированных корнеплодов *Beta vulgaris*. Она появилась только после стрессового воздействия. При солевом стрессе количество лауриновой ЖК возрастало в плазмалемме каллусов *Spartina patens* (Wu et al., 2005). Следует также отметить, что в два раза увеличивалось количество миристиновой (C14:0). Миристиновая ЖК имеет сродство к субъединицам некоторых белков, участвующих в сигналинге. N-миристоилирование может влиять на конформационную стабильность белков (Qi et al., 2000; Qureshi et al., 2013). Кроме того, высокое содержание миристиновой ЖК было обнаружено в фосфатидилинозитах, которые также участвуют в сигнальных каскадах (Leondaritis and Galanopoulou, 2000). Однако

при высокотемпературном стрессе в тонопласте *Ananas comosus* и *Kalanchoë pinnata* количество миристиновой ЖК уменьшилось почти в три раза (Lin et al., 2008).

Таблица 6

Влияние гиперосмотического стресса на жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris*, (% от суммы ЖК)

Жирные кислоты	Контроль	Гиперосмот. стресс
C12:0 , лауриновая	-	0,17 [0,16; 0,18]
C14:0 , миристиновая	0,32 [0,3; 0,34]	0,68 [0,59; 1,21] *
C15:0 , пентадекановая	1,04 [0,97; 1,06]	1,11 [1,05; 1,16]
C16:0 , пальмитиновая	29,53 [29,39; 31,54]	31,58 [31,32; 34,08]
C16:1 , пальмитолеиновая	0,8 [0,72; 0,81]	0,93 [0,84; 1,05]
C17:0 , маргариновая	0,24 [0,24; 0,25]	0,87 [0,6; 1,81]
C18:0 , стеариновая	0,92 [0,9; 0,95]	2,63 [2,19; 9,43] *
C18:1(n-9) , олеиновая	23,01 [22,9; 23,21]	21,18 [18,85; 21,38] *
C18:1(n-7) , цис-вакценовая	0,93 [0,87; 1,02]	0,98 [0,96; 1,09]
C18:2(n-6) , линолевая	39,97 [37,95; 40,08]	36,27 [29,33; 36,61]
C18:3(n-3) , линоленовая	2,77 [2,52; 2,9]	1,97 [1,92; 2,42]
C20:1(n-11) , гадоленовая	0,39 [0,36; 0,39]	0,33 [0,30; 0,42]
C22:0 , бегеновая	0,21 [0,19; 0,24]	0,33 [0,30; 0,35]
ИДС	1,14 [1,089; 1,14]	1,03 [0,94; 1,07]
ΣНЖК	32,16 [31,99; 34,32]	37,58 [36,19; 42,45]
ΣННЖК	67,84 [65,68; 68,01]	62,42 [57,55; 63,81]
ΣННЖК/ΣНЖК	2,11 [1,93; 2,13]	1,66 [1,43; 1,76]

Примечание: n=5. Ме [25%;75%]. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Почти в три раза повысилось содержание стеариновой ЖК (C18:0) в тонопласте после стресса и на восемь процентов понизилось количество

олеиновой ЖК (C18:1(n-9)). Десатурация стеариновой ЖК до олеиновой ЖК, катализируемая стеароил-АПБ-десатуразой, является одной из ключевых реакций в пути биосинтеза ЖК, которая определяет соотношение НЖК и ННЖК (Zhao et al., 2015). Мутация в гене *ssi2/fab2 Arabidopsis thaliana*, который кодирует стеароил-АПБ-десатуразу, приводила к снижению количества олеиновой ЖК в мутантных растениях, а также к конститутивной активации NPR1-зависимых и -независимых защитных реакций (Kachroo et al., 2003). Содержание стеариновой ЖК возрастало в составе липидов плазматических мембран и мембран митохондрий проростков *Pisum sativum* при недостаточном увлажнении (Жигачева и др., 2010). Количество стеариновой ЖК также статистически значимо повышалось при стрессе, вызванном засолением, избытком железа, воздействием высоких температур и при недостаточном азотном питании в культуре клеток *Haematococcus pluvialis* (Lei et al., 2012). При воздействии высоких температур на *Kalanchoë daigremontiana* отмечалось увеличение стеариновой ЖК с 5% до 11% в тонопласте (Behzadipour et al., 1998). Показано, что производство оксида азота в растениях регулируется через олеиновую кислоту. Снижение количества олеиновой кислоты за счет генетической мутации в синтезирующем олеиновую кислоту гене, индуцировало накопление оксида азота и NOA1, который катализирует окисление азота (Mandal et al., 2012). В ответ на высокотемпературный стресс содержание олеиновой ЖК резко снижалось в тонопласте *Kalanchoë pinnata* (Lin et al., 2008).

Общее содержание ФЛ существенно снижалось (на 45%) после гиперосмотического стрессового воздействия (рис. 20). Подобные результаты были получены и в других исследованиях. Существенно уменьшалось количество ФЛ в тонопласте, выделенном из листьев *Ananas comosus* и *Kalanchoe pinnata* при воздействии высоких температур (Lin et al., 2008). После заморозков также уменьшалось суммарное количество мембранных ФЛ из листьев *Coffea sp.* (Campos et al., 2003).

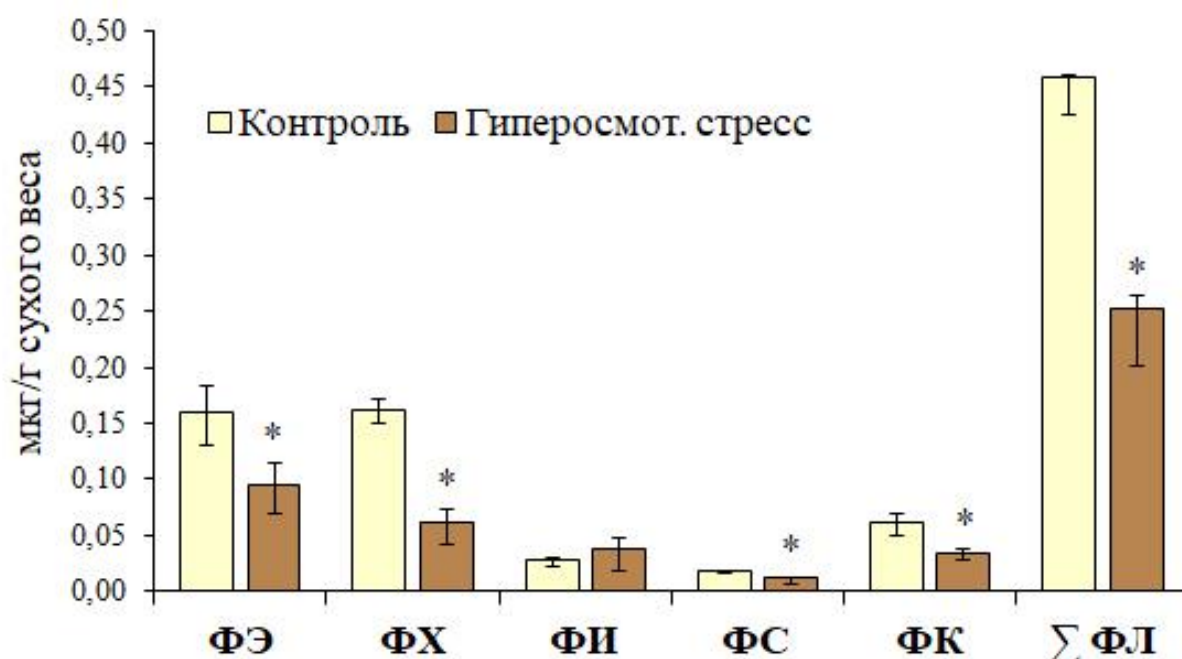


Рис. 20. Содержание фосфолипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: $n=5$. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Однако не всегда суммарное содержание мембранных ФЛ при стрессах уменьшалось. В тонопласте плодов *Ananas comosus* при 10 °С содержание ФЛ снижалось, а при повышении температуры до 25 °С повышалось (Zhou et al., 2014). Количество ФЛ плазматических мембран проростков *Triticum aestivum* повышалось при низкотемпературном закаливании (Bohn et al., 2007). Существенно увеличивалось содержание ФЛ в плазмалемме из листьев *Avena sativa* и *Secale cereale* после холодового закаливания (Uemura and Steponkus, 1994). Отмечено увеличение содержания ФЛ и в плазмалемме, выделенной из каллуса галофитов *Spartina patens*, и оно возрастало по мере усиления стрессовой нагрузки (Wu et al., 2005). Значительно увеличивалось количество суммарных ФЛ в плазмалемме корней проростков *Anacardium occidentale* чувствительных к засолению. Однако в плазматических мембранах

толерантных растений наблюдалось отсутствие изменений в содержании общих ФЛ (Alvarez-Pizarro et al., 2009).

Статистически значимые различия были выявлены и в содержании ФЭ и ФХ, их количество существенно снижалось (на 41,3 и на 63%, соответственно). Подобные результаты были получены в тонопласте после воздействия низких и высоких температур на *Kalanchoe daigremontiana*, что авторы связывали с одним из элементов фенотипической адаптации (Behzadipour et al., 1998). Снижение содержания ФХ и ФЭ, на 20 и 22% соответственно, при низкотемпературном стрессе было обнаружено и у ФЛ тонопласта, выделенного из плодов *Ananas comosus* (Zhou et al., 2014; Zhang et al., 2015). Изменения в содержании ФХ могут быть связаны с увеличением фосфолипазной активности, ранее выявленной на вакуолярной мембране (Tavernier and Pugin, 1995). На мембранах, выделенных из дикого типа *Arabidopsis thaliana* после низкотемпературного стресса, изменения в содержании мембранных липидов также были связаны с повышением липолитической активности и с гидролизом ФЛ (Welti et al., 2002).

Соотношение ФХ/ФЭ при гиперосмотическом стрессе существенно снижалось – на 36% (табл. 5). Подобные результаты были получены исследователями, которые проводили эксперименты на плазмалемме из клеток корней *Avena sativa*: у незакаленных растений соотношение ФХ/ФЭ составляло 1,1, а у закаленных – 0,69 (Norberg and Lijenberg, 1991). Существенно снижалось соотношение ФХ/ФЭ среди липидов плазмалеммы корней *Triticum durum* при выращивании на средах с избыточным содержанием меди с 0,7 в контроле до 0,3, то есть больше, чем в два раза (Berglund et al., 2002). Данное соотношение уменьшалось и в мембранах, выделенных из растений *Arabidopsis thaliana*, подвергнутых холодовому стрессу (Welti et al., 2002). По данным, полученным на плазматических мембранах при солевом стрессе, снижение соотношения ФХ/ФЭ способствовало процессу дегидратации, увеличению проницаемости мембран и могло приводить к стрессовому повреждению

мембран, нарушению их целостности, вызывало образование каналов, через которые осуществлялся пассивный транспорт воды (Wu et al., 2005).

Количество ФС снижалось на 33% после стресса. Такое снижение ФС может быть связано с уменьшением дестабилизации бислоя мембраны. ФС, ФЭ и ФК определяют электроотрицательные свойства мембраны, которые, в свою очередь, регулирует клеточную активность путем направления белков в определенную область мембраны (Platre et al., 2018). ФС необходим в качестве кофактора для нескольких важных ферментов, таких как протеинкиназа С и Raf-1 киназа, которые участвуют в сигнальных путях (Vance and Steenbergen, 2005). У солеустойчивого сорта сладкого картофеля солевой стресс индуцировал накопление ФС, которые снижали старение за счет снижения оттока ионов калия и повышения активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны (Yu et al., 2019).

Содержание ФК в тонопласте статистически значимо уменьшалось после гиперосмотического воздействия (рис. 20), как и после окислительного стресса (рис. 16). Следует отметить, что ФК является не только продуктом гидролиза, но и материалом для синтеза других ФЛ.

Результаты исследований динамики изменения содержания ГЛ в тонопласте после гиперосмотического воздействия (рис. 21) показали, что количество МГДГ и ДГДГ существенно снижались, на 50% и на 62% соответственно. После низкотемпературного воздействия и закаливания суммарное количество ГЛ у растений уменьшалось. Например, в тонопласте *Kalanchoë daigremontiana* отмечалось снижение и МГДГ, и ДГДГ при низкотемпературной акклиматизации (Behzadipour et al., 1998). У *Triticum aestivum* в течение низкотемпературного закаливания при изучении динамики липидов плазмалеммы также отмечено снижение содержания ГЛ и увеличение содержания ФЛ и стерина (Bohn et al., 2007). Снижение суммы ГЛ, вызванное низкими температурами, наблюдалось также в мембранах таких растений как *Secale cereal*, *Avena sativa*, *Solanum species*, *Arabidopsis thaliana* (Lynch and

Steponkus, 1987; Palta et al., 1993; Uemura and Steponkus, 1994; Uemura et al., 1995), но в каждом случае, хотя сумма ГЛ снижалась, были отмечены разносторонние изменения в содержании индивидуальных ГЛ.

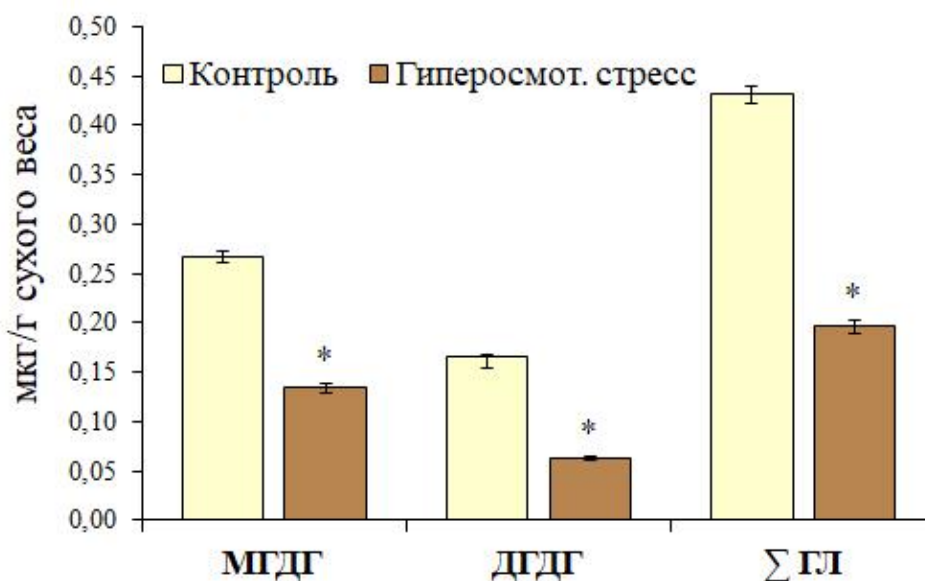


Рис. 21. Содержание гликоглицеролипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: $n=5$. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Изменения в липидном профиле значительно более выражены в растениях устойчивых к обезвоживанию, чем у чувствительных (Gasulla et al., 2013). Содержание МГДГ в изолированных тилакоидах проростков *Triticum durum* неустойчивого сорта повышалось на 15%, а у устойчивого снижалось на 20% (Quartacci et al., 1995). Подобные результаты были получены на разных видах травянистых растений, отличающихся по устойчивости к высокотемпературным воздействиям. Во всех вариантах опыта при переходе от оптимальной температуры к стрессовой содержание МГДГ среди липидов, экстрагированных из листьев, существенно уменьшалось. Причем наиболее интенсивно этот процесс был выражен у растений, обладающих повышенной устойчивостью к изучаемому стрессовому воздействию. Таким образом,

исследователи пришли к заключению, что более интенсивное снижение содержания МГДГ у устойчивых растений объясняет их толерантность к высокой температуре, и связано это с тем, что увеличение содержания МГДГ может нарушать целостность липидного бислоя, вызывая переход в гексагональную липидную фазу (Su et al., 2009). Проводились эксперименты по одновременному определению уровня ГЛ в листьях, в пластидах и в мембранах эндоплазматического ретикулума у *Arabidopsis thaliana* при тепловом стрессовом воздействии. Полученные результаты показали, что разные клеточные мембраны по-разному реагируют на одно и то же стрессовое воздействие, уровень МГДГ среди липидов в листьях и пластидах снижался на 20% и 24% соответственно, тогда как среди липидов эндоплазматического ретикулума содержание МГДГ не менялось (Chen et al., 2006). После солевого стрессового воздействия тоже было отмечено снижение уровня МГДГ в мембранах хлоропластов из клеток мезофилла *Zea mays* (Omoto et al., 2016). Такая же тенденция в содержании МГДГ была обнаружена при недостатке воды в листьях *Gossypium hirsutum* (Pham-Thi et al., 1987), у *Cocos Nucifera* (Repellin et al., 1997) и у *Brassica napus* (Benhassaine-Kesri et al., 2002).

В результате нашего исследования не только резко снижалось содержание ДГДГ, а также отношение ДГДГ к МГДГ (табл. 5) в тонопласте при гиперосмотическом стрессе. По данным других исследователей стресс от засухи в основном приводил к росту количества ДГДГ и ДГДГ/МГДГ. Снижение соотношения ДГДГ/МГДГ встречается редко, но в таких случаях одновременно происходит увеличение МГДГ, что также может быть связано с образованием небислойной гексагональной липидной фазы в мембране. Эта фаза может быть важна для повышения активности определенных мембранных ферментов. Например, с гексагональными структурами связана активность кальциевых помп в саркоплазматическом ретикулуме (Yeagle, 1989), фосфохолинцитидилтрансферазы (Attard et al., 2000) и виолоксантиндеэпоксидазы в тилакоидах (Latowski et al., 2004). В

гексагональной фазе мембраны закрепляются некоторые G-белки и фосфокиназа C (Escriba et al., 1997; Vögler al., 2004). Результаты, полученные в наших экспериментах, свидетельствуют о некотором снижении всех вышеперечисленных показателей при гиперосмотическом стрессе. Такой защитный механизм не был обнаружен на других мембранах, и может быть связан с особенностями строения вакуолярной мембраны, которая, по липидному составу во многом аналогична другим внутриклеточным мембранам, обладает рядом отличий, например, более высоким липид/белковым соотношением (Саляев и др., 1981).

На рисунке 22 показаны изменения содержания стерина в вакуолярных мембранах после гиперосмотического воздействия.

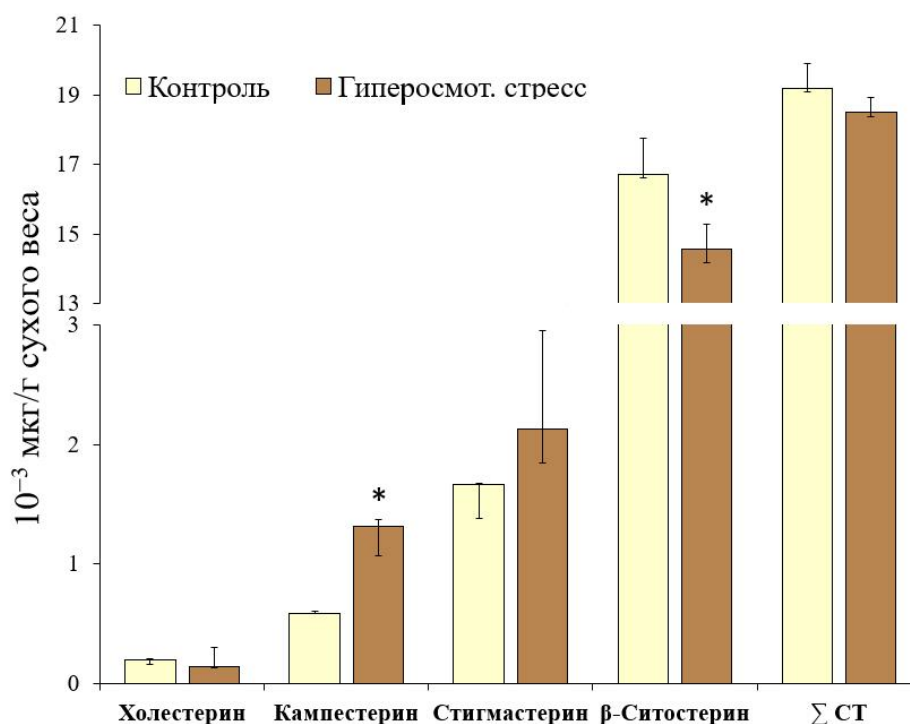


Рис. 22. Содержание стерина в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью H-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

При гиперосмотическом стрессе, несмотря на то что содержание общих стерина в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* статистически значимо не изменилось, отмечены изменения среди следующих классов стерина: уменьшение содержания β -ситостерина и увеличение содержания кампестерина (рис. 22). Кампестерин, как и стигмастерин исследователи считают «стрессовыми» стеринами (Kumar et al., 2015; Валитова и др., 2016). Кроме того, кампестерин используется в синтезе brassinosteroids, которые влияют на мембранный потенциал и состав жирных кислот (Bajguz et al., 2020).

При всех изучаемых нами стрессовых воздействиях увеличивалось соотношение стигмастерин/ β -ситостерин, которое, по мнению ряда исследователей, вызывает активизацию защитных механизмов растительной клетки (Han et al., 2009; Griebel and Zeier, 2010). Однако больше всего это соотношение увеличивалось при гиперосмотическом стрессовом воздействии – на 50% (табл. 5).

Таким образом, при гиперосмотическом стрессовом воздействии суммарное количество липидов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* уменьшалось на 41,8% от контроля. Значительные изменения отмечены в жирнокислотном составе липидов для минорных ЖК. Количество лауриновой, миристиновой и стеариновой ЖК увеличивалось, а содержание линолевой ЖК снижалось. Количество почти всех классов полярных липидов уменьшалось, за исключением ФИ. Установлено, что в условиях стрессового воздействия содержание кампестерина резко возрастало (в два раза), а количество β -ситостерина немного снижалось.

3.4. Влияние гипоосмотического стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта

При воздействии гипоосмотического стрессового воздействия статистически значимых различий в содержании суммарных липидов не было обнаружено (рис. 23).

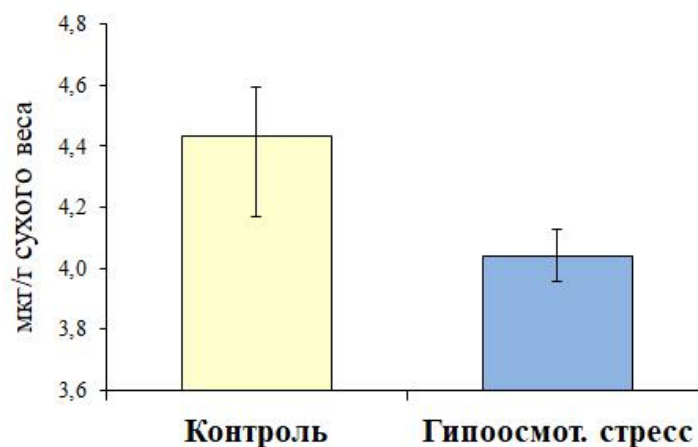


Рис. 23. Содержание суммарных липидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью H-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В нашем исследовании при гипоосмотическом воздействии на тонопласт статистически значимые различия были обнаружены в изменении содержания только минорных ЖК, миристиновой (C14:0), пальмитолеиновой (C16:1(n-9) и C16:1(n-7)) и стеариновой (C18:0), а также появилась лауриновая ЖК (C12:0) (табл. 7). Причем увеличение уровня стеариновой ЖК наблюдалось только при осмотических стрессах. В настоящее время доказана важная роль короткоцепочечных ЖК как сигнальных молекул, принимающих участие в регуляции экспрессии целого ряда генов, регулирующих клеточные функции и поддерживающие гомеостаз (Tan et al., 2014). Кроме того, в исследованиях (Zemanova et al., 2015) по изучению влияния стресса, вызванного ионами кадмия на жирнокислотный состав липидов *Noccaea caerulea*, было высказано предположение об эффективной стратегии ослабления повреждений, вызванных окислительным стрессом, насыщенными короткоцепочечными ЖК (12:0, 14:0), которые являются предшественниками различных НЖК (в основном пальмитиновой).

Таблица 7

Влияние гипоосмотического стресса на жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris*, (% от суммы ЖК)

Жирные кислоты	Контроль	Гипоосмот. стресс
C12:0 , лауриновая	-	0,12 [0,12; 0,13]
C14:0 , миристиновая	0,32 [0,3; 0,34]	0,46 [0,42; 0,46] *
C15:0 , пентадекановая	1,04 [0,97; 1,06]	1,13 [1,08; 1,18]
C16:0 , пальмитиновая	29,53 [29,39; 31,54]	29,3 [29,11; 30,16]
C16:1 , пальмитолеиновая	0,8 [0,72; 0,81]	1,06 [0,99; 1,12] *
C17:0 , маргаринаовая	0,24 [0,24; 0,25]	0,25 [0,24; 0,25]
C18:0 , стеариновая	0,92 [0,9; 0,95]	1,38 [1,28; 1,67] *
C18:1(n-9) , олеиновая	23,01 [22,9; 23,21]	22,54 [22,33; 23,04]
C18:1(n-7) , цис-вакценовая	0,93 [0,87; 1,02]	1,05 [1,02; 1,06]
C18:2(n-6) , линолевая	39,97 [37,95; 40,08]	38,45 [37,91; 38,74]
C18:3(n-3) , линоленовая	2,77 [2,52; 2,9]	2,5 [2,31; 2,58]
C20:0 , арахидиновая	-	0,4 [0,28; 0,41]
C20:1(n-11) , гадоленовая	0,39 [0,36; 0,39]	0,45 [0,3; 0,46]
C20:2(n-9)	-	0,11 [0,1; 0,22]
C22:0 , бегеновая	0,21 [0,19; 0,24]	0,31 [0,27; 0,31]
C22:1(n-11)	-	0,19 [0,16; 0,21]
ИДС	1,14 [1,089; 1,14]	1,1 [1,09; 1,11]
ΣНЖК	32,16 [31,99; 34,32]	33,55 [33,02; 34,37]
ΣННЖК	67,84 [65,68; 68,01]	66,45 [65,63; 66,98]
ΣННЖК/ΣНЖК	2,11 [1,93; 2,13]	1,98 [1,91; 2,03]

Примечание: n=5. Ме [25%;75%]. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее множественное сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

По сравнению с окислительным и гиперосмотическим воздействиями, после гипоосмотического стресса статистически значимые изменения

произошли только с ФИ и ФК (рис. 24). В наших экспериментах только при гипоосмотическом воздействии произошло увеличение ФИ (почти в 2 раза).

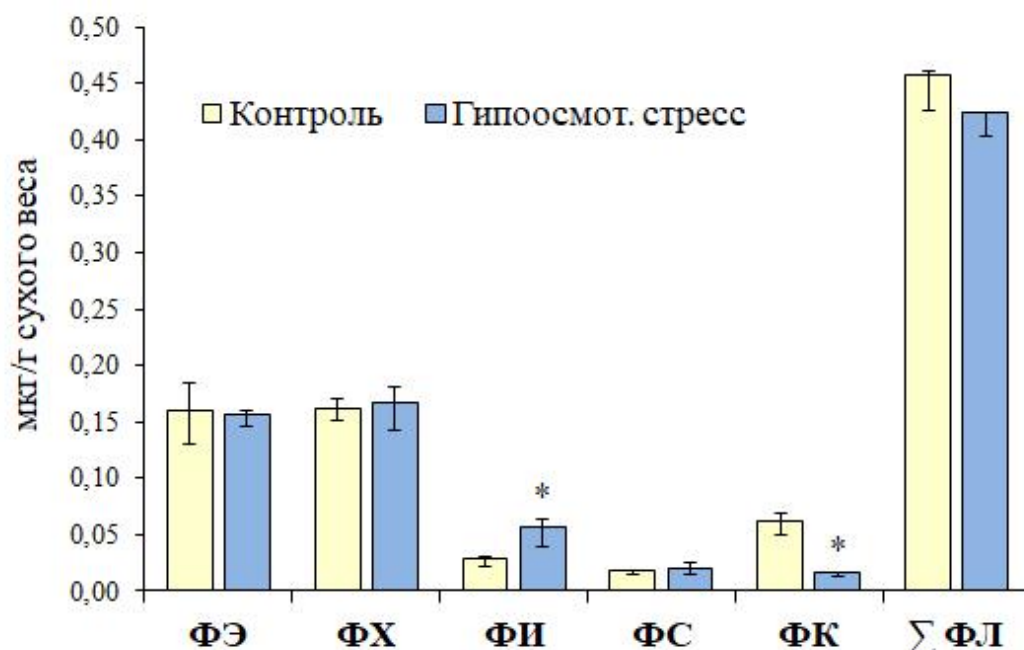


Рис. 24. Содержание фосфолипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Обычно в клеточных мембранах ФИ содержится немного – от 2 до 8% от всех ФЛ, но их функциональная роль велика, особенно в процессах сигналинга (Xue et al., 2009). ФИ участвуют в регуляции содержания внутриклеточного кальция, и повышение количества ФИ может быть связано с процессами адаптации (Berridge and Irvine, 1984). В ряде исследований отмечено существенное (в 1,5-2,5 раза) увеличение содержания этих ФЛ у устойчивых к стрессовому воздействию растений (Su et al., 2009). У неустойчивых к стрессу растений наблюдалась противоположная картина. В плазмалемме, выделенной из плодов *Ananas comosus*, подвергнутых низкотемпературному стрессу, содержание ФИ снижалось с 9,5 до 1,5% (Zhou et al., 2014). Известно, что ФИ выполняют также «якорную» функцию. ФИ с присоединенным к одной из

гидроксильных групп инозита олигосахаридом называют гликозилфосфатидинозитами (ГФИ). С ГФИ некоторые белки образуют ковалентную связь через ФЭ. ГФИ могут направлять белки в микродомены, а также гидролиз ГФИ может регулировать функции белков, позволяя заякоренным белкам диффундировать вне мембраны и участвовать в других клеточных процессах (Yeats et al., 2018).

Количество ФК в тонопласте снизилось на 74% после гипоосмотического стресса, такое снижение наблюдалось и при других стрессах, изучаемых нами (рис. 16, 20, 24). В работах других исследователей количество ФК увеличивалось, но в исследовании воздействия высокой температуры (34 °C) на *Kalanchoe daigremontiana* ФК в тонопласте уменьшалась в два раза (Behzadipour et al., 1998). При изучении низких температур (5 °C) наблюдалось уменьшение ФК (на 40%) в тонопласте клеток *Oryza sativa* устойчивых растений (Kasamo et al., 1992). Такие изменения могут быть защитной реакцией, связанной со стабилизацией ламеллярной структуры мембраны. Стабилизация ламеллярной фазы возможна, поскольку известно, что ФК участвует в образовании гексагональной фазы мембраны, и некоторое снижение ФК может стабилизировать ламеллярную структуру мембраны (Welti et al., 2002).

Несмотря на то, что статистически значимых различий в содержании ФЭ и ФХ не было обнаружено, но отношение ФХ к ФЭ все-таки немного изменялось в сторону увеличения (на 4,9%) (табл. 5). Отношение ФХ к ФЭ показывает устойчивость мембран, поэтому повышение ФХ/ФЭ снижает образование небислойных фаз в мембране.

В условиях гипоосмотического воздействия при анализе содержания ГЛ вакуолярной мембраны обнаружено, что количество МГДГ, а также сумма ГЛ снизились (рис. 25), но такое снижение было не так сильно выражено по сравнению с гиперосмотическим стрессом.

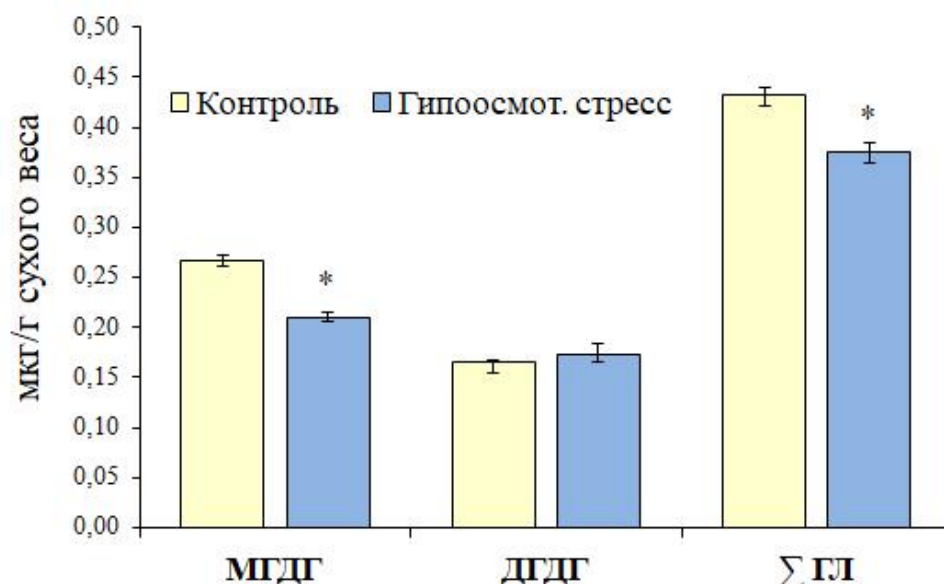


Рис. 25. Содержание гликоглицеролипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: $n=5$. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

После высокотемпературного стрессового воздействия снижение уровня МГДГ было отмечено в мембранах из листьев *Triticum aestivum* (Narayanan et al., 2016). Детальное сравнение растений с различной восприимчивостью к стрессу, вызванному обезвоживанием, показало, что снижение уровня МГДГ сопровождалось увеличением олигогалактолипидов, ФИ и ФК (Okazaki and Saito, 2014). Исследователи предположили, что механизм снижения содержания МГДГ в листьях *Arabidopsis thaliana* может быть вызван усилением деградации и снижением биосинтеза этого ГЛ (Chen et al., 2006). Возможно также, что МГДГ используется для синтеза ДГДГ путем галактозилирования МГДГ с УДФ-галактозой в качестве донора сахара с помощью ДГДГ-синтаз (Kelly et al., 2003). ДГДГ благодаря своей структуре образуют стабильные ламеллярные (двуслойные) структуры. Тем не менее, другие виды стрессового воздействия вызывали противоположные изменения в содержании МГДГ. В мембранах закаленных растений по сравнению с незакаленными содержание МГДГ

увеличивалось на 21% (Welti et al., 2002). Снижение количества МГДГ сопровождалось небольшим увеличением соотношения ДГДГ/МГДГ (на 33,9%) (табл. 5).

Суммарное содержание стерина в наших экспериментах снижалось при гипоосмотическом стрессе (рис. 26).

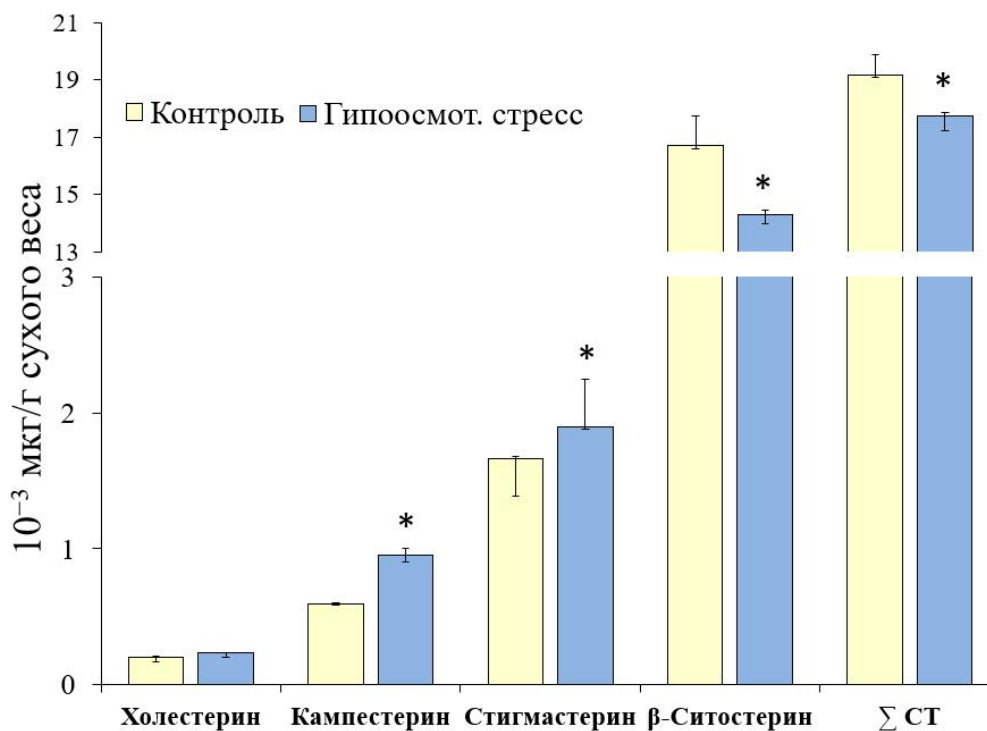


Рис. 26. Содержание стерина в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: n=5. Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В плазмалемме растений *Arabidopsis thaliana*, подвергнутых холодовому воздействию содержание стерина тоже уменьшалось (Takahashi et al., 2016). Отмечено снижение содержания стерина и в плазмалемме каллусов галофита *Spartina patens* при солевом стрессе (Wu et al., 2005). Обнаруженное при гипоосмотическом стрессе снижение содержания стерина может обеспечивать уменьшение микровязкости и повышение проницаемости тонопласта, что при этом стрессе может быть использовано для защиты клетки. Уменьшение

содержания общих стеринах при гипоосмотическом стрессе в вакуолярной мембране связано со снижением количества β -ситостерина, преобладающего среди стеринах. Увеличение содержания стигмастерина и снижение содержания β -ситостерина, вероятно, связано с тем, что β -ситостерин является предшественником стигмастерина. Они оба относятся к 24-этилстеринам, тогда как кампестерин относится к 24-метилстеринам. Его молекула имеет меньшую свободу вращения C-17 углеводородной цепи благодаря более короткому размеру цепи, что позволяет плотнее упаковывать липидный бислой, и это приводит к снижению проницаемости мембраны для заряженных ионов (Edwards and Green, 1972). Отношение стигмастерина к β -ситостерину возрастало (табл. 5).

Таким образом, при гипоосмотическом стрессовом воздействии среди жирнокислотного состава липидов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* возрастало количество минорных ЖК (лауриновой, миристиновой, стеариновой, пальмитолеиновой). При изучении изменений полярных липидов отмечено значительное увеличение количества ФИ и снижение МГДГ и ФК. Среди стеринах возрастало содержание кампестерина и стигмастерина и снижалось количество β -ситостерина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Роль липидов тонопласта в защите растительной клетки от стресса в настоящее время мало исследована. Изучение состава липидов вакуолярной мембраны ранее проводились только при температурных стрессах. В наших экспериментах были обнаружены изменения жирнокислотного состава, фосфолипидов, гликоглицеролипидов и стеринах вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах.

Оценка изменения содержания различных классов липидов в условиях окислительного и осмотических стрессовых воздействий позволяет выделить ряд стратегий защиты растительных клеток от стресса, связанных с липидами вакуолярной мембраны. Можно выделить специфические и неспецифические стратегии. Неспецифические стратегии (табл. 8) характерны для всех изученных видов стресса.

Таблица 8

Неспецифические стратегии защитного действия липидов тонопласта
при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах

Липиды	Окислит. стресс	Гиперосмот. стресс	Гипоосмот. стресс
НЖК	Повышение (на 5,7%)	Повышение (на 16,85%)	Повышение (на 4,3%)
ФК	Снижение (на 68%)	Снижение (на 45%)	Снижение (на 74%)
ФЭ	Снижение (на 8,7%)	Снижение (на 41,25%)	Снижение (на 2,5%)
Стигмастерин	Повышение (на 113%)	Повышение (на 27,9%)	Повышение (на 14%)
Кампестерин	Повышение (на 38,7%)	Повышение (на 122,7%)	Повышение (на 60,8%)
Стигмастерин/ β-ситостерин	Повышение (на 14%)	Повышение (на 50%)	Повышение (на 30%)

К неспецифическим стратегиям относятся: увеличение количества НЖК, главным образом минорных ЖК – лауриновой (C12:0), миристиновой (C14:0) и стеариновой (C18:0) кислоты. Можно также отнести в данную категорию снижение содержания ФК, ФЭ и изменения в содержании стигмастерина, кампестерина и соотношения стигмастерин/ситостерин, которое увеличивалось при всех стрессах.

Специфические стратегии связаны с изменениями содержания липидов, которые различались при разных стрессах (табл. 9). К ним относятся изменения содержания общих и отдельных ГЛ (МГДГ, ДГДГ), изменение содержания суммы стеринов и соотношения ФХ/ФЭ. Из литературных данных известно, что такие изменения часто приводят к активации защитных реакций и стабилизации липидного бислоя. Снижение соотношения ФХ/ФЭ среди мембранных липидов приводит к увеличению проницаемости мембраны, образованию водных каналов. Мы наблюдаем результаты реализации этой стратегии при гиперосмотическом стрессе. Тогда как при гипоосмотическом стрессе для защиты клетки нужно снизить проницаемость тонопласта и соотношение ФХ/ФЭ изменяется в сторону увеличения.

Таблица 9

Специфические стратегии защитного действия липидов тонопласта
при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах

Липиды	Окислит. стресс	Гиперосмот. стресс	Гипоосмот. стресс
ФХ/ФЭ	Снижение (на 6,8%)	Снижение (на 37,2%)	Повышение (на 4,9%)
Σ ГЛ	Повышение (на 74,7%)	Снижение (на 45,5%)	Снижение (на 13%)
МГДГ	Повышение (на 28,3%)	Снижение (на 49,8%)	Снижение (на 21,7%)
ДГДГ	Повышение (на 246,7%)	Снижение (на 62,4%)	Повышение (на 4,8%)
ДГДГ/МГДГ	Повышение (на 168%)	Снижение (на 25,8%)	Повышение (на 33,9%)
Σ СТ	Повышение (на 89,2%)	Снижение (на 3,6%)	Снижение (на 7,4%)

Особенно заметную роль в специфических стратегиях тонопласта играют ГЛ, что, вероятно, связано с их влиянием на переход мембраны из ламеллярного состояния в гексагональное. Это состояние может присутствовать в мембране при гиперосмотическом стрессе, и оно может приводить к активизации определенных ферментов. Из всех изучаемых классов липидов наиболее существенные изменения происходили в содержании стерина, что связано с их ролью в регуляции таких характеристик мембраны как проницаемость, микровязкость и жесткость. По нашему мнению, именно стерин является основным компонентом адаптационных механизмов тонопласта. Изучаемые стрессовые воздействия вызывали изменения в содержании мембранных липидов, что можно рассматривать как элемент фенотипической адаптации (рис. 27).

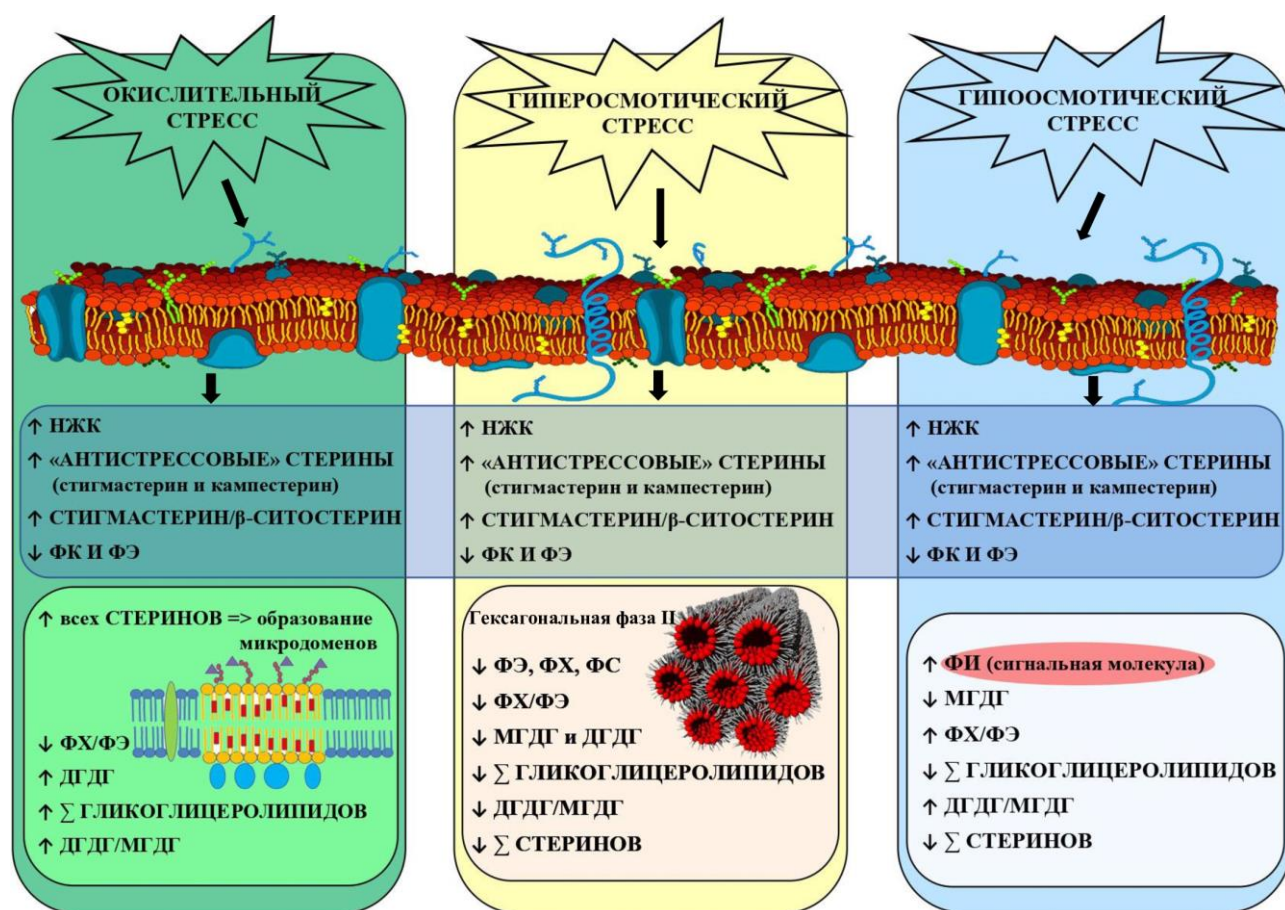


Рис. 27. Схема изменений липидного состава вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного и осмотических стрессовых воздействиях

Обозначения: ↑ – повышение количества липидов, ↓ – снижение количества липидов.

Различные классы липидов вакуолярной мембраны могут принимать участие в защите растительной клетки от абиотических стрессов, с использованием специфических и неспецифических стратегий. Главные из них направлены на стабилизацию липидного бислоя, увеличение содержания липидов, ответственных за активизацию защитных сил (стигмастерин, кампестерин), изменение таких свойств мембраны как проницаемость и микровязкость.

ВЫВОДЫ

1. При изучаемых стрессовых воздействиях отмечены изменения в составе всех классов липидов, что говорит об их участии в защитных механизмах растительной клетки.

2. Наиболее существенные изменения отмечены среди мембранных стеринов, особенно после окислительного стресса.

3. Одна часть выявленных изменений в содержании и составе липидов была присуща всем изучаемым стрессовым воздействиям, другая была характерна только определенному стрессу.

4. При окислительном стрессовом воздействии существенные изменения были отмечены для короткоцепочечных НЖК (лауриновой, пентадекановой, пальмитиновой), ФЭ, ФК и ДГДГ, но наиболее интенсивные изменения происходили в составе стеринов тонопласта – существенно возрастали все классы стеринов.

5. Исследования липидного профиля тонопласта при гиперосмотическом воздействии показали увеличение количества минорных ЖК (лауриновой, миристиновой и стеариновой). Кроме того, снижалось содержание всех полярных липидов и β -ситостерина. Однако, количество кампестерина повышалось в два раза.

6. При изучении гипоосмотического воздействия на липидный состав вакуолярной мембраны установлено, что возрастает содержание минорных ЖК (лауриновой, миристиновой, стеариновой, пальмитолеиновой). Отличительной особенностью этого стресс было двукратное увеличение количество ФИ. Отмечен также рост содержания кампестерина и стигмастерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акмурзина В. А. От анализа липидов к липидомике / В. А. Акмурзина, А. А. Селищева, В. И. Швец // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова. – 2012. – Т. 7, № 6. – С. 3-21.
2. Артюхов В. Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами / В. Г. Артюхов, М. А. Наквасина. – Воронеж: Изд-во Воронеж, 2000. – 296 с.
3. Болдырев А. А. Биомембранология : учеб. пособие / А. А. Болдырев, Е. И. Кяйвярйнен, В. А. Илюха. – Петрозаводск : Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
4. Валитова, Ю. Н. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции / Ю. Н. Валитова, А. Г. Сулкарнаева, Ф. В. Минибаева // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 8. – С. 1050-1068.
5. Васьковский В. Е. Липиды / В. Е. Васьковский // Соросов. образоват. журн. – 1997, № 3. – С. 32-37.
6. Верещагин А. Г. Липиды в жизни растений / А. Г. Верещагин. – М. : Наука, 2007. – 78 с.
7. Верещагин А. Г. Содержание и состав этерифицированных жирных кислот в митохондриях проростков яровизированных семян пшеницы / А. Г. Верещагин, Н. Л. Лебедева, А. В. Жуков [и др.] // Физиология растений. – 1985. – Т. 32. – С. 361-367.
8. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М. : Наука, 1972. – 252 с.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
10. Грищенкова Н. Н. Кондуктометрический метод / Н. Н. Грищенкова, А. С. Лукаткин // Поволжский экологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 3-11.
11. Диффузия липидов в биологических мембранах: учебное пособие / А. В. Филиппов, М. А. Рудакова, Р. С. Гиматдинов, И. Г. Семина. – Казань : КГУ, 2006. – 64 с.

12. Дударева Л. В. Влияние низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на жирнокислотный состав каллусных тканей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Л. В. Дударева, Е. Г. Рудиковская, В. Н. Шмаков // Биол. мембраны. – 2014. – Т. 31, № 5. – С. 364-370.
13. Дударева Л. В. Компонентный состав фитостеринов надземной части хвоща пестрого *Equisetum variegatum* Schleich ex. Web., произрастающего в северо-восточной Якутии / Л. В. Дударева, Н. В. Семенова, В. В. Нохсоров [и др.] // Химия растительного сырья. – 2020. – № 2. – С. 133-148.
14. Жеребцов Н. А. Биохимия / Н. А. Жеребцов, Т. Н. Попова, В. Г. Артюхова. – Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002. – 696 с.
15. Жигачева И. В. Жирнокислотный состав мембран митохондрий при недостаточном увлажнении и обработке фосфорорганическим регулятором роста растений / И. В. Жигачева, Т. А. Мишарина, М. Б. Теренина [и др.] // Биол. мембраны. – 2010. – № 27. – С. 256-261.
16. Жуков А. В. Пальмитиновая кислота и ее роль в строении и функциях мембран растительной клетки / А. В. Жуков // Физиология растений. — 2015. — Т. 62, № 5. — С. 751–760.
17. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М : Мир, 1975. – 324 с.
18. Креславский В. Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе / В. Д. Креславский, Д. А. Лось, С. И. Аллахвердиев [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163-178.
19. Лось Д. А. Восприятие сигналов биологическими мембранами: сенсорные белки и экспрессия генов / Д. А. Лось // Соросов. образоват. журн. – 2001. – Т. 7. – № 9. – С. 14-22.
20. Макаренко С. П. Влияние низких температур на жирнокислотный состав контрастных по холодоустойчивости видов злаков / С. П. Макаренко, Л. В. Дударева, А. И. Катышев [и др.] // Биол. мембраны. – 2010. – Т. 27, № 6. – С. 482-488.

21. Макаренко С. П. Жирные кислоты липидов вакуолей корнеплодов растений / С. П. Макаренко, Т. А. Коненкина, Л. В. Дударева // Биол. мембраны. – 2007. – Т. 24, № 5. – С. 363-369.
22. Макаренко С. П. Химический состав и структура липидов вакуолярных мембран / С. П. Макаренко, Т. А. Коненкина, Р. К. Салаяев // Биол. мембраны. – 1992. – Т. 9, № 3. – С. 290-299.
23. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера. В 3 т. Т. 1 / Д. Нельсон, М. Кокс. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 694 с.
24. Новицкая Г. В. Влияние слабого постоянного магнитного поля на состав и содержание липидов лука разного возраста / Г. В. Новицкая, Т. К. Кочешкова, Ю. Н. Новицкий // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 5. – С. 721-731.
25. Нурминский В. Н. Компьютерная цейтраферная видеосъемка фракции изолированных вакуолей / В. Н. Нурминский, А. М. Корзун, С. В. Розинов [и др.] // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50. – С. 180-187.
26. Пятыгин С. С. Стресс у растений: физиологический подход / С. С. Пятыгин // Журнал общей биологии. – 2008. – Т. 69, № 4. – С. 294-298.
27. Салаяев Р. К. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений / Р. К. Салаяев, В. Я. Кузеванов, В. Я. Хаптагаев [и др.] // Физиология растений. – 1981. – Т. 28, № 6. – С. 1295-1306.
28. Салаяев Р. К. Особенности ультраструктуры и формирования поверхностных мембран у клеток растений / Р. К. Салаяев, В. И. Чернышов // Структура и функции биол. мембран. – М., 1975. – С. 108-119.
29. Филиппов А. В. Диффузия липидов в биологических мембранах / А. В. Филиппов, М. А. Рудакова, Р. С. Гиматдинов [и др.]. – Казань, 2006. – 64 с.
30. Чудинова Л. А. Физиология устойчивости растений: учебное пособие / Л. А. Чудинова, Н. В. Орлова. – Пермь : Изд-во Перм. гос. ун-та, 2006. – 124 с.

31. Alvarez-Pizarro J. Salt-induced changes on H⁺-ATPase activity, sterol and phospholipid content and lipid peroxidation of root plasma membrane from dwarf-cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings / J. Alvarez-Pizarro, C. Gomes-Filho, C. de Lacerda [et al.] // Plant Growth Regul. – 2009. – V. 59. – P. 125-135.
32. Andersson M. X. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol / M. X. Andersson, M. H. Stridh, K. E. Larsson [et al.] // FEBS Lett. – 2003. – V. 537, N 1-3. – P. 128-132.
33. Annunziata I. Isolation of mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and glycosphingolipid-enriched microdomains (GEMs) from brain tissues and neuronal cells / I. Annunziata, A. Pattreson, A. d'Azzo // Methods Mol. Biol. – 2015. – V. 1264. – P. 25-33.
34. Arisz S. A. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in Arabidopsis is generated through diacylglycerol kinase / S. A. Arisz, R. van Wijk, W. Roels W [et al.] // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4. – Art. 1.
35. Attard G. S. Modulation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase by membrane curvature elastic stress / G. S. Attard, R. H. Templer, W. S. Smith [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – P. 9032-9036.
36. Ayala A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M. F. Muñoz, S. Argüelles // Oxid. Med. Cell Longev. – 2014. – Art. ID 360438. – P. 1-31.
37. Bailey-Serres J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity / J. Bailey-Serres, L. A. Voesenek // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – V. 59. – P. 313-339.
38. Bajguz A. Comprehensive overview of the brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections / A. Bajguz, M. Chmur, D. Gruszka // Front. Plant Sci. – 2020. – V. 11. – Art. 1034.

39. Bak G. Rapid structural changes and acidification of guard cell vacuoles during stomatal closure require phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate / G. Bak, E. J. Lee, Y. Lee [et al.] // *Plant Cell*. – 2013. – V. 25, N 6. – P. 2202-2216.
40. Basu D. The mechanosensitive ion channel MSL10 potentiates responses to cell swelling in *Arabidopsis* seedlings / D. Basu, E. S. Haswell // *Curr. Biol*. – 2020. – V. 30, N 14. – P. 2716-2728.
41. Bayle V. *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation / V. Bayle, J. F. Arrighi, A. Creff [et al.] // *Plant Cell*. – 2011. – V. 23, N 4. – P. 1523-1535.
42. Behzadipour M. Phenotypic adaptation of tonoplast fluidity to growth temperature in the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana* ham. et Per. is accompanied by changes in the membrane phospholipid and protein composition / M. Behzadipour, R. Ratajczak, K. Faist [et al.] // *J. Membr. Biol*. – 1998. – V. 166. – P. 61-70.
43. Benhassaine-Kesri G. Drought stress affects chloroplast lipid metabolism in rape (*Brassica napus*) leaves / G. Benhassaine-Kesri, F. Aid, C. Demandre [et al.] // *Physiol. Plantarum*. – 2002. – V. 115. – P. 221-227.
44. Berglund A. H. Alterations of wheat root plasma lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles / A. H. Berglund, M. F. Quaetacci, L. Calucci [et al.] // *Biochem. Biophys. Acta*. – 2002. – V. 1564. – P. 466-472.
45. Berridge M. J. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction / M. J. Berridge, R. F. Irvine // *Nature*. – 1984. – V. 312, N 5992. – P. 315-321.
46. Bhuiyan T. F. Mitigation of PEG-induced drought stress in rapeseed (*Brassica rapa* L.) by exogenous application of osmolytes / T. F. Bhuiyan, K. U. Ahamed, K. Nahar [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2019. – Art. 101197.

47. Bohn M. Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance / M. Bohn, S. Lühje, P. Sperling [et al.] // J. Plant Physiol. – 2007. – V. 164, N 2. – P. 146-156.
48. Browse J. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana* / J. Browse, N. Warwick, C. R. Somerville [et al.] // Biochem. J. – 1986. – V. 235, N 1. – P. 25-31.
49. Campos P. S. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants / P. S. Campos, V. Quartin, J. C. Ramalho [et al.] // J. Plant Physiol. – 2003. – V. 160, N 3. – P. 283-292.
50. Carland F. M. The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning / F. M. Carland, S. Fujioka, S. Takatsuto [et al.] // Plant Cell. – 2002. – V. 14, N 9. – P. 2045-2058.
51. Carter C. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins / C. Carter, S. Pan, J. Zouhar [et al.] // Plant Cell. – 2004. – V. 16, N 12. – P. 3285-3303.
52. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay / A. Catala // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2006. – V. 38, N 9. – P. 1482-1495.
53. Chaudhry S. Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: a comprehensive review / S. Chaudhry, G. P. S. Sidhu // Plant Cell Rep. – 2021.
54. Chen J. Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant atts02 reveals an important role for galactolipids in thermotolerance / J. Chen, J. J. Burke, Z. Xin [et al.] // Plant Cell Environ. – 2006. – V. 29, N 7. – P. 1437-1448.
55. Chen M. Cholesterol accumulation by suppression of SMT1 leads to dwarfism and improved drought tolerance in herbaceous plants / M. Chen, J. Chen, N. Luo [et al.] // Plant Cell Environ. – 2018. – V. 41, N 6. – P. 1417-1426.

56. Choudhury F. K. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination / F. K. Choudhury, R. M. Rivero, E. Blumwald [et al.] // *Plant J.* – 2017. – V. 90, N 5. – P. 856-867.
57. Christie W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis / W. W. Christie // *Advances in Lipid Methodology.* – 1993. – N 2. – P. 69-111.
58. Cui H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging / H. Cui, Y. Kong, H. Zhang // *J. Signal Transduct.* – 2012. – Art. 646354.
59. Cullis P. R. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes / P. R. Cullis, D. de Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – V. – 559, N 4. – P. 399-420.
60. Dawood M. F. A. Spermine-priming restrained water relations and biochemical deteriorations prompted by water deficit on two soybean cultivars / M. F. A. Dawood, A. H. A. Abeed // *Heliyon.* – 2020. – V. 6, N 5. – Art. e04038.
61. De Oliveira L. M. N. Chill-induced changes in fatty acid composition of tonoplast vesicles from hypocotyls of *Vigna unguiculate* (L.) Walp. / L. M. N. de Oliveira, A. C. de M. Sobreira, F. de P. Monteiro [et al.] // *Braz. J. Plant Physiol.* – 2010. – V. 22. – P. 69-72.
62. De Paula F. M. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves / F. M. de Paula, A. P. Thi, J. V. de Silva [et al.] // *Plant Science.* – 1990. – T. 66, N 2. – C. 185-193.
63. De Vries A. H. The binary mixing behavior of phospholipids in a bilayer: a molecular dynamics study / A. H. de Vries, A. E. Mark, S. J. Marrink // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – V. 108. – P. 2454-2463.
64. Di Baccio D. Bleaching herbicide effects on plastids of dark-grown plants: lipid composition of etioplasts in amitrole and norflurazon-treated barley leaves / D. Di Baccio, M. F. Quartacci, F. D. Vecchia [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53. – P. 1857-1865.

65. Dobson G. Mass spectrometry of fatty acid derivatives / G. Dobson, W. W. Christie // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2002. – V. 104. – P. 36-43.
66. Duarte B. Leaf fatty acid remodeling in the salt-excreting halophytic grass *Spartina patens* along a salinity gradient / B. Duarte, A. R. Matos, J. C. Marques [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2018. – V. 124. – P. 112-116.
67. Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton [et al.] // Analytical Chem. – 1956. – V. 28, №3. – P. 350-356.
68. Ebine K. A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana* / K. Ebine, Y. Okatani, T. Uemura [et al.] // Plant Cell. – 2008. – V. 20, N 11. – P. 3006-3021.
69. Edwards P. A. Incorporation of plant sterols into membranes and its relation to sterol absorption / P. A. Edwards, C. Green // FEBS Lett. – 1972. – V. 20, N 1. – P. 97-99.
70. Einspahr K. J. Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism associated with the response of *Dunaliella salina* to hypoosmotic shock / K. J. Einspahr, T. C. Peeler, G. A. Thompson Jr. // J. Biol. Chem. – 1988. – V. 263, N 12. – P. 5775-5779.
71. Ernst R. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids / R. Ernst, C. S. Ejsing, B. Antonny // J. Mol. Biol. – 2016. – V. 428, N 24. – P. 4776-4791.
72. Escriba P. V. Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interaction: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes / P. V. Escriba, A. Ozaita, C. Ribas [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – P. 11375-11380.
73. Fahy E. Lipid classification, structures and tools / E. Fahy, D. Cotter, M. Sud [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – V. 1811, N 11. – P. 637-647.
74. Falcone D. L. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid

composition / D. L. Falcone, J. P. Ogas, C. R. Somerville // BMC Plant Biol. – 2004. – V. 17. – P. 4-17.

75. Ferrer A. Emerging roles for conjugated sterols in plants / A. Ferrer, T. Altabella, M. Arró [et al.] // Prog. Lipid Res. – 2017. – V. 67. – P. 27-37.

76. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. Sloan Stanley // J. Biol. Chem. – 1957 – V. 226 – P. 497-509.

77. Frolov V. A. Lipid polymorphisms and membrane shape / V. A. Frolov, A. V. Shnyrova, J. Zimmerberg // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – V. 3, N 11. – Art. 004747.

78. Fujimoto M. The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria / M. Fujimoto, T. Hayashi, T. P. Su // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – V. 417, N 1. – P. 635-639.

79. Gasulla F. The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: a comparative approach / F. Gasulla, K. Vom Dorp, I. Dombrink [et al.] // Plant J. – 2013. – V. 75, N 5. – P. 726-741.

80. Gigon A. Effect of drought on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia) / A. Gigon, A.-R. Matos, D. Laferay [et al.] // Ann. Bot. – 2004. – V. 94. – P. – 345-351.

81. Gomis A. Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels / A. Gomis, S. Soriano, C. Belmonte C [et al.] // J. Physiol. – 2008. – V. 586, N 23. – P. 5633-5649.

82. Gou J.-Y. Wheat stripe rust resistance protein WKS1 reduces the ability of the thylakoid-associated ascorbate peroxidase to detoxify reactive oxygen species / J.-Y. Gou, L. Kun, W. Kati [et al.] // Plant Cell. – 2015. – V. 27, N 6. – P. 1755-1770.

83. Griebel T. A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions / T. Griebel, J. Zeier // Plant J. – 2010. – V. 63. – P. 253-268.

84. Guerfel M. Changes in lipid composition, water relations and gas exchange in leaves of two young ‘Chemlali’ and ‘Chetoui’ olive trees in response to

water stress / M. Guerfel, O. Baccouri, D. Boujnah [et al.] // Plant Soil. – 2008. – V. 311. – P. 121-129.

85. Ha K. S. Diacylglycerol metabolism in the green alga *Dunaliella salina* under osmotic stress: possible role of diacylglycerols in phospholipase C – mediated signal transduction / K. S. Ha, G. A. Thompson // Plant Physiol. – 1991. – V. 97, N 3. – P. 921-927.

86. Hamberg M. Alpha-oxidation of fatty acid in higher plants / M. Hamberg, A. Sanz, C. J. Castresana // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 24503-24513.

87. Han P. P. Analysis of phospholipids, sterols, and fatty acids in *Taxus Chinensis* var. *mairei* cells in response to shear stress / P. P. Han, J. Zhou, Y. J. Yuan // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2009. – V. 54. – P. 105-112.

88. Harayama T. Understanding the diversity of membrane lipid composition / T. Harayama, H. Riezman // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2018. – N 19. – P. 281-296.

89. Haswell E. S. The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing / E. S. Haswell, P. E. Verslues // J. Gen. Physiol. – 2015. – V. 145, N 5. – P. 389-394.

90. He M. Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance / M. He, C. Q. He, N. Z. Ding // Front. Plant Sci. – 2018. – V. 9. – Art. 1771.

91. He M. Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response / M. He, N. Z. Ding // Front. Plant Sci. – 2020. – V. 11. – Art. 562785.

92. Hernandez J. A. Antioxidant systems and O₂(·-)/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins / J. A. Hernandez, M. A. Ferrer, A. Jimenez [et al.] // Plant Physiol. – 2001. – V. 127, N 3 – P. 817-831.

93. Hidayathulla S. GC/MS analysis and characterization of 2-Hexadecen-1-ol and beta sitosterol from *Schimperia Arabica* extract for its bioactive potential as antioxidant and antimicrobial / S. Hidayathulla, A. A. Shahat, S. R. Ahamad [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2018. – V. 124. – P. 1082-1091.

94. Hodzic A. Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol / A. Hodzic, M. Rappolt, H. Amenitsch [et al.] // *Biophys. J.* – 2008. – V. 94, N 10. – P. 3935-3944.
95. Hong Y. Dual functions of phospholipase D α 1 in plant response to drought / Y. Hong, S. Zheng, X. Wang // *Mol. Plant.* – 2008. – V. 1, N 2. – P. 262-269.
96. Hong Y. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses / Y. Hong, J. Zhao, L. Guo [et al.] // *Prog. Lipid Res.* – 2016. – V. 62. – P. 55-74.
97. Jauh G.-Y. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuole functions / G.-Y. Jauh, T.E. Phillips, J.C. Rogers // *Plant Cell.* – 1999. – V. 11. – P. 1867-1882.
98. Jouhet J. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization / J. Jouhet // *Front. Plant Sci.* – 2013. – V. 4. – Art. 494.
99. Kachroo A. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defense pathways in the *Arabidopsis* ssi2 mutant / A. Kachroo, L. Lapchyk, H. Fukushige [et al.] // *Plant Cell.* – 2003. – V. 15, N 12. – P. 2952-2965.
100. Kapustina I. S. Protective function of lipid rafts / I. S. Kapustina, N. V. Ozolina, V. V. Gurina [et al.] // *Caspian J. of Environmental Sci.* – 2021. – V. 19, N 4. – P. 685-690.
101. Kasamo K. Low temperature – induced changes in the thermotropic properties and fatty acid composition of the plasma membrane and tonoplast of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells / K. Kasamo, F. Kagita, H. Yamanishi [et al.] // *Plant and Cell Physiol.* – 1992. – V. 33, N 5. – P. 609-616.
102. Kelly A. A. Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis / A. A. Kelly, J. E. Froehlich, P. Dörmann // *Plant Cell.* – 2003. – V. 15, N 11. – P. 2694-2706.

103. Koffman J. S. Opposing effects of cAMP and T259 phosphorylation on plasma membrane diffusion of the water channel aquaporin-5 in madin-darby canine kidney cells / J. S. Koffman, E. C. Arnsperg, S. Marlar [et al.] // PLoS One. – 2015. – V. 10, N 7. – Art. e0133324.
104. Krishania S. Strategies of adaptation and injury exhibited by plants under a variety of external conditions / S. Krishania, P. Dwivedi, K. Agarwal // *Comunicata Scientiae*. – 2013. – V. 4, N 2. – P. 103-110.
105. Kumar M. S. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice / M. S. Kumar, K. Ali, A. Dahuja [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2015. – V. 96. – P. 83-89.
106. Lamers J. How plants sense and respond to stressful environments / J. Lamers // *Plant Physiol.* – 2020. – V. 182, N 4. – P. 1624-1635.
107. Larkindale J. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene / J. Larkindale, B. Huang // *J. Plant Physiol.* – 2004. – V. 161, N 4. – P. 405-413.
108. Latowski D. Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, required lipid inverted hexagonal structures for its activity / D. Latowski, H. E. Akerlund, K. Strzalka // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – P. 4417-4420.
109. Lee A. G. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective / A. G. Lee // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – V. 1612, N 1. – P. 1-40.
110. Lee C. W. Characterization of the L lambda phase in trehalose-stabilized dry membranes by solid-state NMR and X-ray diffraction // C. W. Lee, S. K. Das Gupta, J. Mattai [et al.] // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28, N 12. – P. 5000-5009.
111. Lei A. Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors / A. Lei, H. Chen, G. Shen [et al.] // *Biotechnol. Biofuels*. – 2012. – V. 5. – P. 1-11.

112. Leigh R. A. An attempt to use isolated vacuoles to determine the distribution of sodium and potassium in cells of storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.) / R.A. Leigh, A.D. Tomos // *Planta*. – 1983. – V. 159, N 5. – P. 469-475.
113. Leigh R. A. The location of acid invertase activity and sucrose in the vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*) / R. A. Leigh, T. Rees, W. A. Fuller [et al.] // *Biochem. J.* – 1979. – V. 178. – P. 539-547.
114. Leondaritis G. Characterization of inositol phospholipids and identification of a mastoparan-induced polyphosphoinositide response in *Tetrahymena pyriformis* / G. Leondaritis, D. Galanopoulou // *Lipids*. – 2000. – V. 35, N 5. – P. 525-532.
115. Levental I. The continuing mystery of lipid rafts / I. Levental, S. Veatch // *J. Mol. Biol.* – 2016. – V. 428, N 24 (Pt A). – P. 4749-4764.
116. Li-Beisson Y. Acyl-lipid metabolism / Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson [et al.] // *The Arabidopsis book*. – 2013 – N 11. – Art. e0161.
117. Lichtenthaler H. K. The stress concept in plants: an introduction / H. K. Lichtenthaler // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1998. – V. 851. – P. 187-198.
118. Lim G. H. Fatty acid- and lipid-mediated signaling in plant defense / G. H. Lim, R. Singhal, A. Kachroo [et al.] // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2017. – V. 55. – P. 505-536.
119. Lin Q. Effects of high night temperature on lipid and protein compositions in tonoplasts isolated from *Ananas comosus* and *Kalanchoe pinnata* leaves / Q. Lin, Y. M. Wang, A. Nose [et al.] // *Biol. Plant.* – 2008. – V. 52. – P. 59-64.
120. Liu Y. Drought resistance mechanisms of *Phedimus aizoon* L. / Y. Liu, Z. He, Y. Xie [et al.] // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11, N 1. – Art. 13600.
121. Luo L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China / L. J. Luo // *J. Exp. Bot.* – 2010. – V. 61, N 13. – P. 3509-3517.
122. Lynch D. V. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimate ion of winter rye seedlings (*Secale cereal* L. cv Puma) / D. V. Lynch, P. L. Steponkus // *Plant Physiol.* – 1987. – V. 83. – P. 761-767.

123. Lyons J. M. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants / J. M. Lyons, T. A. Weaton, Y.K. Pratt // *Plant Physiol.* – 1964. – V. 39. – P. 266-268.
124. Madey E. Isolation and characterization of lipid in phloem sap of canola / E. Madey, L. M. Nowack, J. E. Thompson // *Planta.* – 2002. – V. 214, N4. – P. 625-634.
125. Madina M. H. Vacuolar membrane structures and their roles in plant-pathogen interactions / M. H. Madina, M. S. Rahman, H. Zheng [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2019. – V. 101, N 4-5. – P. 343-354.
126. Mandal M. K. Oleic acid-dependent modulation of NITRIC OXIDE ASSOCIATED1 protein levels regulates nitric oxide-mediated defense signaling in *Arabidopsis* / M. K. Mandal, A. C. Chandra-Shekara, R. D. Jeong [et al.] // *Plant Cell.* – 2012. – V. 24, N 4. – P. 1654-1674.
127. Mansour M. M. F. Salt acclimation of *Triticum aestivum* by choline chloride: Plant growth, mineral content, and cell permeability / M. M. F. Mansour, E. J. Stadelmann, O. Y. Lee-Stadelmann // *Plant Physiol. Biochem.* – 1993. – V. 31. – P. 341-348.
128. Martinoia E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism / E. Martinoia, M. Maeshima, H. E. Neuhaus // *J. Exp. Bot.* – 2007. – V. 58. – P. 83-102.
129. Marty F. Analytical characterization of beetroot vacuole membrane / F. Marty, D. Branton // *J. Cell. Biol.* – 1980. – V. 87, N 1. – P. 72-83.
130. Marty F. Plant vacuoles / F. Marty // *Plant Cell.* – 1999. – V. 11. – P. 587-600.
131. Mason J. T. Investigation of phase transitions in bilayer membranes / J. T. Mason // *Methods Enzymol.* – 1998. – V. 295. – P. 468-494.
132. McLoughlin F. Identification of novel candidate phosphatidic acid-binding proteins involved in the salt-stress response of *Arabidopsis thaliana* roots / F.

McLoughlin, S. A. Arisz, H. L. Dekker [et al.] // *Biochem. J.* – 2013 – V. 450, N 3. – P. 573-581.

133. Mene-Saffrane L. Nonenzymatic oxidation of trienoic fatty acids contributes to reactive oxygen species management in *Arabidopsis* / L. Mene-Saffrane, L. Dubugnon, A. Chetelat [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284, N 3. – P. 1702-1708.

134. Michaud M. Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria / M. Michaud, W. A. Prinz, J. Jouhet // *FEBS J.* – 2017. – V. 284, N 3. – P. 376-390.

135. Moller I. M. Oxidative modifications to cellular components in plants / I. M. Moller, P. E. Jensen, A. Hansson // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – V. 58. – P. 459-481.

136. Mongrand S. Lipid rafts in higher plant cells / S. Mongrand, J. Morel, J. Laroche [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 36277-36286.

137. Moradi P. Lipidomics unravels the role of leaf lipids in hyme plant response to drought stress / P. Moradi, A. Mahdavi, M. Khoshkam [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18, N 10. – Art. 2067.

138. Moreau R. A. Phytosterols and their derivatives: structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses / R. A. Moreau, L. Nystrom, B. D. Whitaker [et al.] // *Prog. Lipid Res.* – 2018. – V. 70. – P. 35-61.

139. Muramatsu K. Electron spin resonance studies of dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing soybean-derived sterylglucoside / K. Muramatsu, T. Masumizu, Y. Maitani [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 2000. – V. 201. – P. 610-613.

140. Nalina M. Water deficit-induced oxidative stress and differential response in antioxidant enzymes of tolerant and susceptible tea cultivars under field condition / M. Nalina, S. Saroja, M. Chakravarthi [et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2021. – V. 43. – Art. 10.

141. Narayanan S. Wheat leaf lipids during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations / S. Narayanan, P. J. Tamura, M. R. Roth [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2016. – V. 39, N 4. – P. 787-803.
142. Naudi A. Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity / A. Naudi, M. Jove, V. Ayala [et al.] // *Front. Physiol.* – 2013. – V. 4. – Art. 372.
143. Neuhaus H. E. Regulation of transport processes across the tonoplast / H. E. Neuhaus, O. Trentmann // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 5. – Art. 460.
144. Nicolson G. L. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years / G. L. Nicolson // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1838, N 6. – P. 1451-1466.
145. Norberg P. Lipids of membranes prepared from oat root cells / P. Norberg, C. Lijenberg // *Plant. Physiol.* – 1991. – V. 96. – P. 1136-1141.
146. Novakova P. SAC phosphoinositide phosphatases at the tonoplast mediate vacuolar function in *Arabidopsis* / P. Novakova, S. Hirsch, E. Feraru [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – V. 111, N 7. – P. 2818-2823.
147. Novitskaya G. V. The effects of a weak permanent magnetic field on the lipid composition and content in the onion leaves of various ages / G. V. Novitskaya, T. K. Kocheshkova, Y. I. Novitskii // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2006. – 53, N 5. – P. 638-648.
148. Ohlrogge J. Lipid biosynthesis / J. Ohlrogge, J. Browse // *Plant Cell.* – 1995. – V. 7. – P. 957-970.
149. Ohyama K. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis* / K. Ohyama, M. Suzuki, J. Kikuchi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – V. 106, N 3. – P. 725-730.
150. Okazaki Y. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants / Y. Okazaki, K. Saito // *Plant J.* – 2014. – V. 79, N 4. – P. 584-596.

151. Olshyk V. N. Influence of lipids with hydroxyl-containing head groups on Fe²⁺ (Cu²⁺)/H₂O₂-mediated transformation of phospholipids in model membranes / V. N. Olshyk, I. V. Melsitova, I. L. Yurkova // Chem. Phys. Lipids. – 2014. – V. 177. P. 1-7.
152. Omoto E. Salinity induces membrane structure and lipid changes in maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts / E. Omoto, Y. Iwasaki, H. Miyake [et al.] // Physiol Plant. – 2016. – V. 157, N 1. – P. 13-23.
153. Orvar B. L. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity / B. L. Orvar, V. Sangwan, F. Omann [et al.] // Plant J. – 2000. – V. 23, N 6. – P. 785-794.
154. Ozolina N. V. Changes in composition of vacuolar membrane lipid fatty acids under osmotic stress / N. V. Ozolina, I. S. Nesterkina, L.V. Dudareva [et al.] // J. Stress Physiol. Biochem. – 2016. – V. 12, N 1. – P. 31-41.
155. Ozolina N. V. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains / N. V. Ozolina, I. S. Nesterkina, E. V. Kolesnikova [et al.] // Planta. – 2013. – V. 237. – P. 859-871.
156. Palta J. P. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species / J. P. Palta, B. D. Whitaker, L. S. Weiss [et al.] // Plant Physiol. – 1993. – V. 103. – P. 793-803.
157. Park J. S. Waterlogging induced oxidative stress and the mortality of the Antarctic plant, *Deschampsia antarctica* / J. S. Park, E. J. Lee // J. Ecol. Environ. – 2019. – V. 43, N 1. – Art. 29.
158. Perera N. M. Hypo-osmotic stress activates Plc1p-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and inositol Hexakisphosphate accumulation in yeast / N. M. Perera, R. H. Michell, S. K. Dove // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, N 7. – P. 5216-5226.
159. Perlikowski D. Remodeling of leaf cellular glycerolipid composition under drought and re-hydration conditions in grasses from the *Lolium-Festuca*

complex / D. Perlikowski, S. Kierszniowska, A. Sawikowska [et al.] // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7. – Art. 1027

160. Pham-Thi A. T. Effects of drought on [1-14C]-oleic and [1-14C]-linoleic acid desaturation in cotton leaves / A. T. Pham-Thi, C. Borrel-Flood, J. Veira da Silva [et al.] // *Physiol. Plantarum*. – 1987. – V. 69. – P. 147-150.

161. Pical C. Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells / C. Pical, T. Westergren, S. K. Dove // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274, N 53. – P. 38232-38240.

162. Pietuch A. Membrane tension homeostasis of epithelial cells through surface area regulation in response to osmotic stress / A. Pietuch, B. R. Bruckner, A. Janshoff // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2013. – V. 1833, N 3. – P. 712-722.

163. Platre M. P. Combinatorial lipid code shapes the electrostatic landscape of plant / M. P. Platre, L. C. Noack, M. Doumane [et al.] // *Endomembranes. Dev. Cell*. – 2018. – V. 45, N 4. – P. 465-480.

164. Poirier Y. Mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate / Y. Poirier, S. Thoma, C. Somerville [et al.] // *Plant Physiol.* – 1991. – V. 97, N 3. – P. 1087-1093.

165. Polashock J. J. Expression of the yeast delta-9 fatty acid desaturase in *Nicotiana tabacum* / J. J. Polashock, C. K. Chin, C. E. Martin // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 100, N 2. – P. 894-901.

166. Pommerrenig B. In concert: orchestrated changes in carbohydrate homeostasis are critical for plant abiotic stress tolerance / B. Pommerrenig, F. Ludewig, J. Cvetkovic [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2018. – V. 59, N 7. – P. 1290-1299.

167. Portero-Otin M. Correlation of fatty acid unsaturation of the liver mitochondrial phospholipid classes in mammals to their maximum life span potential / M. Portero-Otin, M. Bellmut, M. Ruiz [et al.] // *Lipids*. – 2001. – V. 36. – P. 491-498.

168. Prost I. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens / I. Prost, S. Dhondt, G. Rothe [et al.] // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139, N 4. – P. 1902-1913.
169. Qi Q. Molecular cloning, genomic organization, and biochemical characterization of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase from *Arabidopsis thaliana* / Q. Qi, R. V. Rajala, W. J. Anderson [et al.] // *Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, N 13. – P. 9673-9683.
170. Quartacci M. F. Lipid composition and protein dynamics in thylakoids of two wheat cultivars differently sensitive to drought / M. F. Quartacci, C. Pinzino, C. L. Sgherri [et al.] // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 108. – P. 191-197.
171. Qureshi M. I. Effect of long-term salinity on cellular antioxidants, compatible solute and fatty acid profile of Sweet Annie (*Artemisia annua* L.) [et al.] / M. I. Qureshi, M. Z. Abdin, J. Ahmad // *Phytochemistry.* – 2013. – V. 95. – P. 215-223.
172. Rawat N. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same / N. Rawat, S. L. Singla-Pareek, A. Pareek // *Physiol. Plant.* – 2021. – V. 171, N 4. – P. 653-676.
173. Reboucas D. M. Combined effects of ozone and drought on the physiology and membrane lipids of two compea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivars / D. M. Reboucas, Y. M. de Sousa, M. Bagard [et al.] // *Plants.* – 2017. – V. 6, N 1. – Art. 14.
174. Repellin A. Leaf membrane lipids and drought tolerance in young coconut palms (*Cocos Nucifera* L.) / A. Repellin, A. T. Pham-Thi, A. Tushakorie [et al.] // *European J. Agronomy.* – 1997. – V. 6. – P. 25-33.
175. Roche J. Sterol content in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) as affected by genotypes and environmental conditions / J. Roche, M. Alignan, A. Bouniols [et al.] // *Food Chem.* – 2010. – V. 121. – P. 990-995.
176. Rogowska A. The role of sterols in plant response to abiotic stress / A. Rogowska, A. Szakiel // *Phytochem. Rev.* – 2020. – V. 19. – P. 1525-1538.

177. Roughan P. G. Quantative analysis of sulfolipid (sulfoquinovosyl diglyceride) and galactolipids (monogalactosyl and digalactosyl diglycerides) in plant tissues / P. G. Roughan, R. D. Batt // *Anal. biochem.* – 1968. – V. 22. – P. 74-88.
178. Russell N. J. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms / N. J. Russell // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1989. – V. 21, N 1. – P. 93-113.
179. Saito K. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology / K. Saito, F. Matsuda // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2010. – V. 61. – P. 463-489.
180. Sanders D. Communicating with calcium / D. Sanders, C. Brownlee, J. F. Harper // *Plant Cell.* – 1999. – V. 11, N 4. – P. 691-706.
181. Sang Y. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis* / Y. Sang, D. Cui, X. Wang // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126, N 4. – P. 1449-1458.
182. Sankhagowit S. Oxidation of membrane curvature-regulating phosphatidylethanolamine lipid results in formation of bilayer and cubic structures / S. Sankhagowit, E. Y. Lee, G. C. L. Wong [et al.] // *Langmuir.* – 2016. – V. 32, N 10. – P. 2450-2457.
183. Sanz A. PLOX, a new pathogeninduced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase / A. Sanz, J. I. Moreno, C. Castresana // *Plant Cell.* – 1998. – V. 10. – P. 1523-1537.
184. Schuler I. Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers / I. Schuler, A. Milon, Y. Nakatani [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1991. – V. 88, N 16. – P. 6926-6930.
185. Seleiman M. F. Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects / M. F. Seleiman, N. Al-Suhaibani, N. Ali [et al.] // *Plants.* – 2021. – V. 10, N 2. – Art. 259.

186. Selye H. A syndrome produced by diverse nucuous agents / H. Selye // Nature. – 1936. – N 138. – 32–34.
187. Sharma P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [et al.] / P. Sharma, A. Jha, R. S. Dubey // J. Botany. – 2012. – P. 1-26.
188. Simons K. Functional rafts in cell membranes / K. Simons, E. Ikonen // Nature. – 1997. – V. 387, N 6633. – P. 569-572.
189. Simons K. Membrane organization and lipid rafts / K. Simons, J. L. Sampaio // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – V. 3, N 10. – Art. 004697.
190. Singh A. Tissue specific and abiotic stress regulated transcription of histidine kinases in plants is also influenced by diurnal rhythm / A. Singh, H. R. Kushwaha, P. Soni [et al.] // Front. Plant Sci. – 2015. – V. 6. – Art. 711.
191. Singh, H. P. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation / H. P. Singh, D. R. Batish, R. K. Kohli [et al.] // Plant Growth Regul. – 2007. – V. 53. – P. 65-73.
192. Slack C. R. Labelling studies in vivo on the metabolism of the acyl and glycerol moieties of the glycerolipids in the developing maize leaf / C. R. Slack, P. G. Roughan, N. Balasingham // Biochem J. – 1977. – V. 162, N 2. – P. 289-296.
193. Sonawane P. D. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism / P. D. Sonawane, J. Pollier, S. Panda [et al.] // Nat. Plants. – 2016. – V. 3. – Art. 16205.
194. Su K. Membrane lipid composition and heat tolerance in cool-season turfgrasses, including a hybrid bluegrass / K. Su, D. J. Bremer, R. Jeannotte [et al.] // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 2009. – V. 134. – P. 511-520.
195. Tachikawa M. Lysophospholipids enhance taurine release from rat retinal vascular endothelial cells under hypoosmotic stress / M. Tachikawa, K. Tsuji, S. Ikeda [et al.] // Microvasc. Res. – 2009. – V. 78, N 3. – P. 332-337.

196. Taiz L. Plant Physiology / L. Taiz, E. Zeiger – Sunderland : Sinauer Associates, 2010. – 782 p.
197. Takahashu D. Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance / D. Takahashu, H. Imai, Y. Kawamura [et al.] // Cryobiology. – 2016. – V. 72. – P. 123-134.
198. Tan J. The role of short-chain fatty acids in health and disease / J. Tan, C. McKenzie, M. Potamitis [et al.] // Adv. Immunol. – 2014. – V. 121. – P. 91-119.
199. Tavernier E. Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells / E. Tavernier // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. – V. 1167, N 3. – P. 242-247.
200. Tavernier E. Phospholipase activities associated with the tonoplast from acer pseudoplatanus cells: Identification of a phospholipase a1 activity / E. Tavernier, A. Pugin // Biochem. Biophys. Acta. – 1995. – V. 1233. – P. 118-122.
201. Torres-Franklin M.-L. Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves / M.-L. Torres-Franklin, A. Gigon, D. F. de Melo [et al.] // Physiol. Plantarum. – 2007. – V. 131, N 2. – P. 201-210.
202. Toumi I. Water stress induced changes in the leaf lipid composition of four grapevine genotypes with different drought tolerance / I. Toumi, M. Gargouri, I. Nouairi [et al.] // Biol. Plant. – 2008. – V. 52. – P. 161-164.
203. Tshabuse F. Glycerolipid analysis during desiccation and recovery of the resurrection plant *Xerophyta humilis* (Bak) Dur and Schinz / F. Tshabuse, J. M. Farrant, L. Humbert [et al.] // Plant Cell Environ. – 2018. – V. 41, N 3. – P. 533-547.
204. Uemura M. A Contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance / M. Uemura, P. L. Steponkus // Plant Physiol. – 1994. – V. 104, N 2. – P. 479-496.

205. Uemura M. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-Induced lesions) / M. Uemura, R. A. Joseph, P. L. Steponkus // Plant Physiol. – 1995. – V. 109, N 1. – P. 15-30.
206. Van Blitterswijk W. J. Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements / W. J. Van Blitterswijk, R. P. Van Hofven, B. W. Van der Meer // BBA. – 1981. – V. 644. – P. 323-332.
207. Van Zelm E. Salt tolerance mechanisms of plants / E. van Zelm, Y. Zhang, C. Testerink [et al.] // Annu. Rev. Plant Biol. – 2020. – V. 71. – P. 403-433.
208. Vance J. E. Metabolism and functions of phosphatidylserine / J. E. Vance, R. Steenbergen // Prog. Lipid Res. – 2005. – V. 44, N 4. – P. 207-234.
209. Vaskovsky V. E. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms / V. E. Vaskovsky, N. A. Latyshev // J. Chromatogr. – 1975. – V. 115, N 1. – P. 246-249.
210. Verhoek B. Lipids and enzymatic activities in vacuolar membranes isolated via protoplasts from oat primary leaves / B. Verhoek, R. Haas, K. Wrage [et al.] // Z. Naturforsch. – 1983. – V. 38. – P. 770-777.
211. Vogler O. The Gbetagamma dimer drives the interaction of heterotrimeric Gi proteins with nonlamellar membrane structures. / O. Vogler, J. Casas, D. Capo [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, N 35. – P. 36540-36545.
212. Wang D. Zygosaccharomyces rouxii combats salt stress by maintaining cell membrane structure and functionality / D. Wang, M. Zhang, J. Huang [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2020. – V. 30, N 1. – P. 62-70.
213. Wang S. Y. Effects of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria xananassa* Duch.) / S. Y. Wang, H. S. Lin // Sci. Hort. – 2006. – V. 108. – P. 35-42.
214. Wang W. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance / W. Wang, B. Vinocur, A. Altman // Planta. – 2003. – V. 218, N 1. – P. 1-14.

215. Wang X. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses / X. Wang // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139, N 2. – P. 566-573.
216. Wang Y. Dynamic changes in membrane lipid composition of leaves of winter wheat seedlings in response to PEG-induced water stress / Y. Wang, X. Zhang, G. Huang [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2020. – V. 20. – Art. 84.
217. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development / C. Wasternack // *Ann. Bot.* – 2007. – V. 100, N 4. – P. 681-697.
218. Welti R. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis* / R. Welti, W. Li, M. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, N 35. – P. 31994-32002.
219. Wilkins K. A. Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots / K. A. Wilkins, E. Matthus, S. M. Swarbreck [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7. – Art. 1296.
220. Wolff R. L. Structure, practical sources (gymnosperm seeds), gas-chromatographic data (equivalent chain lengths), and mass spectrometric characteristics of all-cis ω 5-olefinic acids / R. L. Wolff, W. W. Christie // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2002. – V. 104. – P. 234-244.
221. Wu J. L. Salt tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition / J. L. Wu, D. M. Seliskar, J. L. Gallagher // *Physiol. Plantarum.* – 1998. – Vol. 102, N 2. – P. 307-317.
222. Wu J. The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress / J. Wu, D. M. Seliskar, J. L. Gallagher // *Am. J. Bot.* – 2005. – V. 92, N. 5. – P. 852-858.
223. Wu S. Molybdenum induces alterations in the glycerolipidome that confer drought tolerance in wheat / S. Wu, C. Hu, X. Yang [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2020. – V. 71, N 16. – P. 5074-5086.

224. Xalxo R. Hydrolytic enzymes mediated lipid-DNA catabolism and altered gene expression of antioxidants under combined application of lead and simulated acid rain in Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) seedlings / R. Xalxo, S. Keshavkant // *Ecotoxicology*. – 2018. – V. 27, N 10. – P. 1404-1413.
225. Xue H.-W. Function and regulation of phospholipid signaling in plants / H.-W. Xue, X. Chen, Y. Me // *Biochem. J.* – 2009. – V. 421. – P. 145-156.
226. Yamaguchi M. Modulation in the activity of purified tonoplast H⁺-ATPase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells / M. Yamaguchi, K. Kasamo // *Plant Cell Physiol.* – 2001. – V. 42. – P. 516-523.
227. Yamaoka Y. Phosphatidylserine synthase1 is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana* / Y. Yamaoka, Y. Yu, J. Mizoi [et al.] // *Plant J.* – 2011. – V. 67, N 4. – P. 648-661.
228. Yeagle P. L. Lipid regulation of cell membrane structure and function / P. L. Yeagle // *FASEB J.* – 1989. – V. 3. – P. 1833-1842.
229. Yeats T. H. Plant glycosylphosphatidylinositol anchored proteins at the plasma membrane-cell wall nexus / T. H. Yeats, A. Bacic, K. L. Johnson // *J. Integr. Plant Biol.* – 2018. – V. 60, N 8. – P. 649–669.
230. Yoshida S. Lipid composition of plasma membranes and tonoplast isolated from etiolated seedlings of *Mung Bean* / S. Yoshida, M. Uemura // *Plant Physiol.* – 1986. – V. 82. – P. 807-812.
231. Yu L. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana* / L. Yu, J. Nie, C. Cao [et al.] // *New Phytol.* – 2010. – V.188, N 3. – P. 762-773.
232. Yu Y. Involvement of phosphatidylserine and triacylglycerol in the response of sweet potato leaves to salt stress / Y. Yu, M. Kou, Z. Gao [et al.] // *Front Plant Sci.* – 2019. – V. 10. – Art. 1086.

233. Yuan F. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis* / F. Yuan, H. Yang, Y. Xue [et al.] // Nature. – 2014. – V. 514, N 7522. – P. 367-371.
234. Zahedi S. M. Exogenous melatonin mitigates salinity-induced damage in olive seedlings by modulating ion homeostasis, antioxidant defense and phytohormone balance / S. M. Zahedi, M. S. Hosseini, N. Fahadi Hoveizeh [et al.] // Physiol. Plant. – 2021.
235. Zemanova V. Fatty acid profiles of ecotypes of hyperaccumulator *Noccaea caerulea* growing under cadmium stress / V. Zemanova, M. Pavlik, P. Kyjakova [et al.] // J. Plant Physiol. – 2015. – V.180. – P. 27-34.
236. Zhai S. M. Overexpression of the phosphatidylinositol synthase gene from *Zea mays* in tobacco plants alters the membrane lipids composition and improves drought stress tolerance / S. M. Zhai, Q. Gao, H. W. Xue [et al.] // Planta. – 2012. V. 235, N 1. – P. 69-84.
237. Zhang C. Plant vacuole morphology and vacuolar trafficking / C. Zhang, G.R. Hicks, N.V. Raikhel // Front. Plant Sci. – 2014. – V. 5. – P. 476-485.
238. Zhang M. DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development / M. Zhang, J. Fan, D.C Taylor [et al.] // Plant Cell. – 2009. – V. 21. – P. 3885-3901.
239. Zhang W. Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling / W. Zhang, C. Qin, J. Zhao [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2004. – V. 101, N 25. – P. 9508-9513.
240. Zhang W. The oleate-stimulated phospholipase D, PLDdelta, and phosphatidic acid decrease H_2O_2 -induced cell death in *Arabidopsis* / W. Zhang, C. Wang, C. Qin [et al.] // Plant Cell. – 2003. – V. 15, N 10. – P. 2285-2295.

241. Zhang X. Highlights to phytosterols accumulation and equilibrium in plants: biosynthetic pathway and feedback regulation / X. Zhang, K. Lin, Y. Li // Plant Physiol. Biochem. – 2020. – V. 155. – P. 637-649.

242. Zhao N. Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds / N. Zhao, Y. Zhang, Q. Li [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2015. – V. 87. – P. 9-16.

243. Zheng G. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels / G. Zheng, B. Tian, F. Zhang [et al.] // Plant Cell Environ. – 2011. – V. 34, N 9. – P. 1431-1442.

244. Zhou Y. Low temperature alters plasma membrane lipid composition and ATPase activity of pineapple fruit during blackheart development / Y. Zhou, X. Pan, H. Qu [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr. – 2014. – V. 46, N 1. – P. 59-69.

245. Zhou Y. Tonoplast lipid composition and proton pump of pineapple fruit during low-temperature storage and blackheart development / Y. Zhou, X. Pan, H. Qu [et al.] // J. Membr. Biol. – 2014. – V. 247. – P. 429-439.

246. Zhu Y. GhPLP2 positively regulates cotton resistance to verticillium wilt by modulating fatty acid accumulation and jasmonic acid signaling pathway / Y. Zhu, X. Hu, P. Wang [et al.] // Front. Plant Sci. – 2021. – V. 12. – Art. 749630.

247. Zonia L. Osmotically induced cell swelling versus cell shrinking elicits specific changes in phospholipid signals in tobacco pollen tubes / L. Zonia, T. Munnik // Plant Physiol. – 2004. – V. 134, N 2. – P. 813-823.